



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**Facultad de Ciencias Químicas**  
**Carrera de Bioquímica y Farmacia**

**Composición fitoquímica de los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* y *Citrus limonia* y actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus subsp. aureus* cepa ATCC 25923**

**Trabajo de titulación previo  
a la obtención del título de  
Bioquímico Farmacéutico**

**Autores:**

Leonardo Enrique Castro Garzón      C.I. 1724792385

**Correo electrónico:** leokira06@gmail.com

Dario Vinicio Castro Urdiales      C.I. 0106222136

**Correo electrónico:** c\_vinicio@outlook.com

**Directora:**

Dra. Claudia Janneth Carchipulla Sanango

C.I. 0301497780

**Asesora:**

Dra. Nancy Mirian Cuzco Quizhpi

C.I. 0301624854

**Cuenca – Ecuador**  
**26 - Febrero - 2020**

## RESUMEN

Actualmente la ciencia ha puesto en marcha un auge investigativo a través del regreso en la historia al estudio de especies vegetales con potenciales actividades biológicas, siendo la propiedad antimicrobiana el principal motivo de interés, con el fin de contrarrestar muchos problemas relacionados con microorganismos patógenos en especial aquellos capaces de desarrollar mecanismos de resistencia frente a tratamientos antimicrobianos habituales como *Staphylococcus aureus*. En este proyecto se llevó a cabo un estudio de tipo exploratorio y cuasi-experimental en donde se determinó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales (AEs) de las especies vegetales *Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum* frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Los aceites esenciales fueron obtenidos por arrastre por vapor de agua, consiguiendo un rendimiento del 0.64 % para *Citrus limonia* y 1.19 % para *Syzygium aromaticum*, posteriormente se identificaron los componentes bioactivos principales por cromatografía en capa fina (TLC) en función de sus factores de retención y características colorimétricas, demostrando la presencia de limoneno, citral, geraniol, trans-cariofileno, alfa-pineno, alfa-terpineno y eugenol en el AE de *Citrus limonia* y eugenol en *Syzygium aromaticum*; finalmente se determinó la actividad antimicrobiana de los AEs frente la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mediante el método estandarizado de macrodilución en caldo obteniendo una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.6 % para el AE de *Citrus limonia* y 0.3 % para *Syzygium aromaticum*; y una concentración mínima bactericida (CMB) mediante la técnica de extensión en agar de 2.5 % y 1.25 % respectivamente.

**Palabras clave:** Aceite esencial. Limón mandarina. Clavo de olor. Cromatografía en capa fina. Actividad antimicrobiana. Concentración mínima inhibitoria. Concentración mínima bactericida. *Staphylococcus aureus*.

## ABSTRACT

Currently, science has launched a research boom through the return in history to study plant species with potential biological activities, being the main antimicrobial property of interest, in order to counteract many problems related to pathogenic microorganisms, especially those capable of developing resistance mechanisms against usual antimicrobial treatments such as *Staphylococcus aureus*. In this project an exploratory and quasi-experimental study was conducted in which the antimicrobial activity of the essential oils (AEs) of the plant species *Citrus limonia* and *Syzygium aromaticum* against the *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bacteria was determined. The oils essential were obtained by steam traction, obtaining a yield of 0.64% for *Citrus limonia* and 1.19% for *Syzygium aromaticum*, subsequently the main bioactive components were identified by TLC based on their retention factors and colorimetric characteristics, demonstrating the presence of Limonene, Citral, Geraniol, Trans-Caryophyllene, Alpha-Pinene, Alpha-Terpinen and Eugenol in the *Citrus Limon* AE and Eugenol in *Syzygium aromaticum*; finally, the antimicrobial activity of the AEs was determined against the *Staphylococcus aureus* strain ATCC 25923 by means of the standardized method of macrodilution in broth, obtaining a MIC of 0.6% for the *Citrus limonia* AE and 0.3% for *Syzygium aromaticum*; and a CMB using the agar extension technique of 2.5% and 1.25% respectively.

**Keywords:** Essential oil. Mandarin lemon. Clove. Thin layer chromatography. Antimicrobial activity. Minimum inhibitory concentration. Minimum bactericidal concentration. *Staphylococcus aureus*.



## Tabla de contenido

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
AGRADECIMIENTOS	11
AGRADECIMIENTOS	12
DEDICATORIAS	13
DEDICATORIAS	14
CAPÍTULO 1	15
ANTECEDENTES	15
1.1 Introducción	15
1.2 Identificación del problema	16
1.3 Justificación	17
1.4 Hipótesis	18
1.5 Objetivos general y específicos	18
1.5.1 Objetivo general	18
1.5.2 Objetivos específicos	18
CAPÍTULO 2	19
MARCO TEÓRICO	19
2.1 Aceites esenciales	19
2.1.1 Propiedades de los aceites esenciales	19
2.1.2 Volatilidad de los aceites esenciales	20
2.1.3 Métodos de extracción	21
2.1.4 Conservación de los aceites esenciales	23
2.1.5 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	23
2.2 <i>Citrus limonia</i> (Limón mandarina)	24
2.3 Clavo de olor ( <i>Syzygium aromaticum</i> )	26



2.4 Cromatografía	28
2.5 Cromatografía en capa fina (TLC)	29
2.6 <i>Staphylococcus aureus</i>	34
2.7 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	37
2.7.1 Difusión en agar por discos de papel o método de Kirby Bauer modificado	39
2.7.2 Macrodilución en caldo	39
CAPÍTULO 3	41
METODOLOGÍA	41
3.1 Tipo de investigación	41
3.2 Ubicación	41
3.3 Obtención y procesamiento de la materia prima	42
Recolección	42
Procesamiento pre-extracción	43
3.4 Extracción de los aceites esenciales de <i>Citrus limonia</i> y <i>Syzygium aromaticum</i> mediante destilación por arrastre de vapor	43
3.5 Determinación cualitativa de los principales metabolitos secundarios presentes en los aceites esenciales de <i>Citrus limonia</i> y <i>Syzygium aromaticum</i> mediante cromatografía en capa fina (TLC)	44
3.6 Actividad antimicrobiana y estimación de la CMI y CMB de los aceites esenciales de <i>Citrus limonia</i> y <i>Syzygium aromaticum</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	48
3.6.1 Método de difusión en agar por disco	48
3.6.2 Macrodilución en caldo	49
CAPÍTULO 4	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1. Rendimiento de los aceites esenciales de <i>Citrus limonia</i> y <i>Syzygium aromaticum</i>	53
4.2 Factores de retención y caracterización colorimétrica de los analitos presentes en el aceite esencial de <i>Citrus limonia</i> por TLC	54



4.3 Factores de retención y caracterización colorimétrica de los analitos presentes en el aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> por TLC	55
4.4 Determinación de la actividad antimicrobiana de los AEs de <i>Citrus limonia</i> y <i>Syzygium aromaticum</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 por difusión en agar	57
4.5 Resultados obtenidos por el método de macrodilución en caldo: CMI y CMB de los aceites esenciales de <i>Citrus limonia</i> y <i>Syzygium aromaticum</i>	58
CONCLUSIONES	63
RECOMENDACIONES	64
BIBLIOGRAFÍA y REFERENCIAS:	65
ANEXOS	77



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio  
Institucional

---

Yo Leonardo Enrique Castro Garzón en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Composición fitoquímica de los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* y *Citrus limonia* y actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus subsp. aureus* cepa ATCC 25923", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 26 de Febrero de 2020

Leonardo Enrique Castro Garzón

C.I: 172479238-5



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio  
Institucional

---

Yo Dario Vinicio Castro Urdiales en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Composición fitoquímica de los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* y *Citrus limonia* y actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus subsp. aureus* cepa ATCC 25923", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 26 de Febrero de 2020

---

Dario Vinicio Castro Urdiales

C.I: 010622213-6



### Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Yo Leonardo Enrique Castro Garzón, autor del trabajo de titulación "Composición fitoquímica de los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* y *Citrus limonia* y actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus subsp. aureus* cepa ATCC 25923", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 26 de Febrero de 2020



Leonardo Enrique Castro Garzón

C.I: 172479238-5



### Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Yo Dario Vinicio Castro Urdiales, autor del trabajo de titulación "Composición fitoquímica de los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* y *Citrus limonia* y actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus subsp. aureus* cepa ATCC 25923", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 26 de Febrero de 2020

---

Dario Vinicio Castro Urdiales

C.I: 010622213-6



## **AGRADECIMIENTOS**

Después de haber transcurrido un largo periodo en el cual me he ido formando tanto profesional como personalmente dentro de esta honorable institución. Quiero hacer presentes mis más grandes agradecimientos.

Primeramente quiero agradecer a mis padres, quienes han sido pilar fundamental dentro mi formación, ya que gracias al apoyo incondicional que me han brindado día a día me ha permitido avanzar hacia adelante y alcanzar una de mis metas más anheladas que es culminar mi formación como Bioquímico Farmacéutico.

Agradezco también a la Dra. Claudia Carchipulla, quien siendo directora de este proyecto y más aún por haber sido nuestra tutora en diferentes áreas dentro de nuestra carrera, por habernos transmitido parte de su conocimiento, y por todo su apoyo brindado hacia nosotros para la realización de este proyecto. De igual manera agradezco a la Dra. Nancy Cuzco por su colaboración y apoyo dentro de este proyecto por habernos guiado en cada uno de los procedimientos empleados en el mismo y gracias a esto haber alcanzado los resultados esperados.

En conjunto agradezco también a las Dras. Norma Cedillo, Andrea Cabrera, Maritza Ochoa; al Bqf. Fernando Huiracocha y al Dr. Fabián León por su colaboración en la elaboración de este proyecto, ya que sin su apoyo no hubiese sido posible el desarrollo del mismo.

No quiero terminar sin antes agradecer a mi compañero de tesis Leonardo. Gracias por haber realizado este último trabajo juntos, creo que como muchas otras veces logramos cumplir con nuestro objetivo. Gracias por ser un excelente compañero y un gran amigo de verdad muchas gracias y muchos éxitos a la vida futura.

Y finalmente quiero agradecer a la Universidad de Cuenca por haber sido el lugar en donde cumplí uno de mis más grandes sueños; sus aulas, sus pasillos, todos aquellos lugares en donde pasé momentos inolvidables, en donde hice nuevas amistades y viví un periodo muy importante de mi vida. Muchas gracias.

**Dario Vinicio Castro Urdiales**



## AGRADECIMIENTOS

En el presente trabajo investigativo le agradezco a Dios por bendecirnos cada día, por guiar nuestro camino y ser nuestro sustento en los momentos más duros de nuestra vida.

A mis padres, por ser mis guías, por siempre estar allí para motivarme y ser los impulsores principales en este trayecto.

A mi tío el Dr. Wilson Castro quien siendo como un segundo padre para mí y un ejemplo a seguir, siempre supo brindarme su apoyo incondicional durante el lapso de mi vida tanto personal como estudiantil.

A mi compañero de tesis Vinicio Castro, con quien he compartido muchos momentos de mi vida universitaria y puedo llamar amigo, le agradezco por su confianza, respeto y solidaridad, y sin más sabiendo que es una persona de bien, le deseo éxitos en su vida tanto personal como laboral.

Finalmente quiero agradecer a la Universidad de Cuenca por haberme permitido formarme como profesional en tal prestigiosa institución. A mis tutoras Dra. Claudia Carchipulla y Dra. Nancy Cuzco quienes compartieron sus conocimientos y supieron dar las directrices necesarias para la culminación de la presente investigación. A la Dra. Maritza Ochoa, Dra. Norma Cedillo, Dra. Andrea Cabrera, Dr. Fabián León y Bqf. Fernando Huiracocha, quienes nos prestaron su ayuda de una manera solidaria, cordial, respetuosa y profesional en todo momento.

**Leonardo Enrique Castro Garzón**



## **DEDICATORIAS**

Quiero dedicar este trabajo a mis padres Segundo y Livia quienes han sido el motor principal para que yo pueda culminar con mis estudios universitarios, ya que sin ellos esto no hubiera sido posible; a mis hermanos y familiares que han estado siempre apoyándome y dando ánimos; a mis amigos y compañeros con los que hemos llevado una vida como familia dentro de la universidad. Les dedico esta tesis como símbolo de agradecimiento por haberme acompañado durante todo el camino que tuve que recorrer para llegar hasta aquí. Muchas gracias.

**Dario Vinicio Castro Urdiales**



## **DEDICATORIAS**

Esta tesis se la dedico a mis padres Gonzalo Castro y Lilia Garzón quienes han sido mi motivo de superación y fortaleza. A mi tío el Dr. Wilson Castro quien ha sido mi ejemplo a seguir, y a quien considero un segundo padre para mí, me ha brindado su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida. A mis bisabuelos Ubaldino Machuca y Olimpia Condo que en paz descansen y a mi abuelita Olga Machuca quienes me han inculcado los más grandes valores que una persona puede tener como son el esfuerzo, la responsabilidad y dedicación. A mis demás familiares y amigos quienes sin su motivación no hubiera sido posible culminar con el presente trabajo.

**Leonardo Enrique Castro Garzón**

## CAPÍTULO 1

### ANTECEDENTES

#### 1.1 Introducción

En la actualidad la medicina tradicional ha logrado alcanzar un auge debido su gran interés como opción terapéutica en un sin número de afecciones, por lo que muchas poblaciones y comunidades consideran esta práctica como medio de tratamiento, prevención de dolencias y enfermedades o para complementar el tratamiento médico habitual, en general buscando mejorar su calidad de vida (López Sánchez, 2005). La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la medicina tradicional como “El conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales” (OMS, 2013).

La población ecuatoriana debido a su cultura se encuentra estrechamente ligada al uso de plantas medicinales para el tratamiento de algunas afecciones, lo que genera gran interés por buscar un avance en el estudio de esta práctica. En el Ecuador existen alrededor de 2900 plantas de uso medicinal, de las cuales un gran porcentaje ha sido utilizado desde la antigüedad como medio de tratamiento para resfríos, cefaleas, como cicatrizantes, para tratar molestias estomacales, combatir infecciones, en otras (Cerón Martínez, 2006).

Gran porcentaje de las especies vegetales, en especial plantas del tipo aromático son capaces de producir aceites esenciales, sustancias que otorgan el olor característico, coadyuvan en la polinización y protegen a las plantas a través del metabolismo secundario. Diferentes procesos analíticos han permitido determinar la composición química y posibles actividades biológicas de muchos aceites esenciales convirtiéndolos en un recurso de interés dentro del ámbito farmacéutico, cosmético y alimentario (Sierra, Barros, Gómez, Mejía, & Suárez, 2018).

Los aceites esenciales (AEs) de una gran variedad de especies han sido estudiados como posibles alternativas para tratar infecciones causadas por microorganismos patógenos, fundamentándose en la presencia de componentes activos capaces de interactuar con bacterias principalmente a nivel de la pared y membrana celular de naturaleza lipofílica, ocasionando una alteración a nivel de las capas de polisacáridos, ácidos grasos y

fosfolípidos, la salida de componentes intracitoplasmáticos y consecuentemente la muerte de la célula bacteriana (Bustos, Hamdan, & Gutiérrez, 2006; Rueda & Cuadro, 2012).

La industria farmacéutica ha desarrollado continuamente nuevas moléculas y medicamentos de origen natural y sintéticos para tratar de erradicar o controlar un sinnúmero de infecciones causadas por microorganismos patógenos como es el caso de *Staphylococcus aureus*, una bacteria Gram positiva capaz de ocasionar infecciones comunitarias y hospitalarias que alcanzan una tasa de mortalidad del 60%, en su mayoría pacientes con bacteriemia, motivo que causa incertidumbre en el tratamiento antibiótico habitual debido a la aparición de cepas resistentes (Belloso, 2010; Usano et al., 2014).

Este trabajo determinó la presencia de los componentes bioactivos más representativos que constituyen los aceites esenciales de las especies vegetales *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y *Citrus limonia* (limón variedad mandarina), empleando cromatografía en capa fina (TLC); y la posible actividad antimicrobiana frente a una cepa estandarizada de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mediante macrodilución en caldo, representando dicha actividad por la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) (Argote, et al., 2017; Armas, et al., 2011; Pardo et al., 2017; Wagner & Bladt, 1996).

## 1.2 Identificación del problema

*Staphylococcus aureus* ha generado un gran impacto en la salud mundial debido a que, a pesar de que en la mayoría de los casos no produce afecciones graves, puede provocar enfermedades que ponen en riesgo la vida del paciente si llegan a comprometer órganos vitales, es así que, la OMS clasifica a *S. aureus* como un patógeno de prioridad elevada debido a que en las últimas décadas este microorganismo ha ido adquiriendo resistencia a múltiples antibióticos y ante la creciente problemática es indispensable buscar nuevas alternativas para hacer frente a este tipo de microorganismos ya que las opciones terapéuticas habituales para tratarlas se encuentran cada vez más limitadas. Diversos estudios realizados con aceites esenciales de plantas usadas comúnmente en la medicina tradicional han generado datos sostenibles acerca del potencial antimicrobiano que pueden llegar a tener muchas especies vegetales (Rueda & Cuadro, 2012; OPS, 2013; Gil, 2000; Miranda Novales, 2011).



### 1.3 Justificación

En el Ecuador existe una gran variedad de plantas medicinales de las cuales se ha podido extraer aceites esenciales debido a la actividad que otorgan sus principios activos, los cuales, mediante procesos tecnológicos con el pasar de los años han llegado a formar parte de distintos productos, tanto en el área de la cosmética, de alimentos, así como en productos farmacéuticos; sin embargo, las propiedades medicinales son las que sobresalen por el auge investigativo que busca combinar la medicina tradicional con la moderna en la generación de nuevas opciones terapéuticas (Herrero, 2015).

*Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum* son dos especies vegetales conocidas en el ámbito culinario, sin embargo, sus cualidades medicinales también los hace conocidos en la terapéutica tradicional principalmente debido a sus propiedades antimicrobianas, por lo que el estudio de sus aceites esenciales, los cuales concentran gran porcentaje de los principios activos presentes en el vegetal, permite confirmar y dar soporte a dichas creencias populares (Aguilar & López Malo, 2014; Contreras et al., 2014).

Es por esto que se planteó utilizar los aceites esenciales de *Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum* para realizar la identificación cualitativa de sus componentes bioactivos empleando para ello la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) y posteriormente determinar la sensibilidad *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, por el método de difusión en agar (Aguilar & López Malo, 2014; Contreras et al., 2014).

La considerable cantidad de compuestos fenólicos como eugenol y acetato de eugenilo presentes en el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* y compuestos terpénicos como limoneno,  $\beta$ -pineno y  $\gamma$ -terpineno en el aceite esencial de la mayoría de los cítricos sugieren una capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano al entrar en contacto con su estructura celular, si bien el mecanismo de acción de los AEs no se encuentra del todo esclarecido, estudios mencionan que la posible actividad antimicrobiana se debe a la sinergia de los componentes que los constituyen, interactuando con la pared y membrana celular causando una desestabilización de la misma a causa de la hidrofobicidad de los AEs llevando al microorganismo a su muerte (Armas, et al., 2011; Argote, et al., 2017).

La finalidad de este proyecto fue aportar información respecto a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los AEs de *Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mismo que se llevó a

cabo en base a estudios realizados por Fu et al. (2007) y Argote et al. (2017) quienes estudiaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales del género *Citrus* y de *Syzygium aromaticum* respectivamente frente a *S. aureus*; de modo que los resultados obtenidos puedan aportar al desarrollo científico e impulsar al continuo estudio de la biodiversidad del país en el ámbito terapéutico.

#### 1.4 Hipótesis

Los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* y *Citrus limonia* son capaces de inhibir el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

#### 1.5 Objetivos general y específicos

##### 1.5.1 Objetivo general

Determinar las composición fitoquímica de los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* y *Citrus limonia* y actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923.

##### 1.5.2 Objetivos específicos

- Identificar los principales constituyentes presentes en los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* y *Citrus limonia* por el método de cromatografía en capa fina (TLC).
- Establecer la CMI de los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* y *Citrus limonia* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mediante el método de macrodilución en caldo.
- Establecer la CMB de los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* y *Citrus limonia* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mediante el método extensión en agar.

## CAPÍTULO 2

### MARCO TEÓRICO

Ecuador es conocido por su inmensa biodiversidad tanto en fauna como flora siendo este último de gran interés científico por las propiedades medicinales en potencia que poseen, de las cuales solo un pequeño porcentaje ha sido estudiado y caracterizado; la práctica de la medicina tradicional se ha mantenido viva con el pasar de los años, impartiendo estos conocimientos de generación en generación a diferencia de los países industrializados en los cuales estas prácticas han sido reemplazadas por los avances científicos enfocadas a nuevas técnicas para el tratamiento y prevención de muchas enfermedades, de las cuales gran parte se fundamentan en conocimientos tradicionales (Cabrera et al., 2005; Bellosos, 2010).

La OMS aunque acepta la existencia de las prácticas alternativas a la medicina, trata de limitar su alcance hacia la población debido al poco fundamento del que gozan algunas de estas técnicas, sin embargo, tiene en mención particularmente a la fitoterapia (OMS, 2013).

A diferencia de la OMS, las organizaciones no gubernamentales (ONG) como la ONG de la salud, no limita esta práctica a la población, por el contrario la incentivan. Hoy en día, al menos en Ecuador la práctica por parte de los chamanes ha sido motivo de apoyo, incentivación y apreciación, hasta el punto de ser reconocido como patrimonio cultural (Ortega, 2018).

#### 2.1 Aceites esenciales

El aceite esencial (AE) constituye un grupo de mezclas complejas de distintos compuestos derivados del metabolismo secundario de ciertas plantas, principalmente en las denominadas “plantas aromáticas” la síntesis y almacenamiento de estos compuestos se produce en distintas estructuras localizadas en hojas, flores, frutos, etc (Rodas Ceballos, 2012; Usano et al. 2014).

##### 2.1.1 Propiedades de los aceites esenciales

Los AEs generalmente conforman del 0,01 al 10% del peso total de las plantas, las estructuras especializadas en su producción se encuentran en la superficie de la estructura vegetal como células oleíferas (Rodas Ceballos, 2012; SENA, 2010).

Algunas de las propiedades físicas más estudiadas son: elevada volatilidad, líquidos a temperatura ambiente, solubles en alcohol de alto porcentaje, densidad menor al agua

(excepciones), insoluble en agua, incoloros o amarillentos en un principio y alto índice de refracción (López et al., 2009).

La mayoría de los AEs poseen muchos constituyentes químicos en su composición pudiendo contener de 50 a 300 compuestos diferentes, a los cuales se les ha acreditado las propiedades biológicas que los caracterizan (Ruiz, Díaz, & Rojas, 2015). En la tabla 1 se presentan las propiedades biológicas de algunos AEs.

**Tabla 1.** Propiedades biológicas de los principales aceites esenciales

Propiedad	Aceite esencial	Función
Antiséptico	Limón, tomillo, naranja, bergamota, clavo, menta, romero, eucalipto	Combate mohos, bacterias Gram positivas y Gram negativas
Antitóxica	Lavanda, tomillo, salvia, romero	Inhibe productos que degradan células
Cicatrizante	Lavanda, laurel, salvia, sándalo	Estimulan la regeneración celular
Antiparasitarios	Tomillo, Geranio, Laurel	Ahuyentan polillas y mosquitos
Antivenenoso	Lavanda, geranio	Neutralizan venenos de abejas, avispa y arañas
Tonificante	Pino, geranio, albahaca, romero	Estimulan glándulas endocrinas y corteza suprarrenal
Antiespasmódica	Lavanda, mejorana, verbena, melisa	Tratamiento de cólicos, colon irritable e hipo
Antirreumática y antineurálgica	Romero, manzanilla	Tratamiento de afecciones articulares

**Fuente:** (Padrini & Lucheroni, 2000)

### 2.1.2 Volatilidad de los aceites esenciales

La velocidad con la que los AEs se diseminan en el aire se conoce como índice de volatilidad (Stashenko, 2009). En la tabla 2 se presenta una escala de volatilidad de algunos aceites esenciales.

**Tabla 2.** Índice de volatilidad de aceites esenciales

<b>Índice Superior</b>	5	Eucalipto
	18	Romero
	30	Ciprés
	47	Manzanilla
	55	Bergamota
	65	Hisopo
	68	Cardamomo
<b>Índice Intermedio</b>	70	Menta
	72	Limón
	79	Azahar
	80	Clavo
	82	Salvia
	85	Lavanda
	86	Poleo
<b>Índice Inferior</b>	99	Rosa
	100	Pachulí
	100	Benjuí

**Fuente:** (Padrini & Lucheroni, 2000)

De esta manera según se tiene una clasificación de los aceites esenciales agrupándolos en tres categorías:

- Índice superior: esencias ligeras que se evaporan rápidamente.
- Índice intermedio: esencias que se evaporan a una velocidad intermedia.
- índice inferior o básico: esencias que se evaporan con mayor lentitud.

### 2.1.3 Métodos de extracción

Es importante tener en cuenta que no se puede extraer AEs de todas las plantas (Albarracín & Gallo, 2003). En la tabla 3 se presenta un resumen de los métodos de extracción de aceites esenciales y mezcla aromáticas.

**Tabla 3.** Métodos de extracción de aceites esenciales y mezclas aromáticas

Método	Procedimiento		Producto
Métodos directos	Prensado	Compresión de pericarpio	Aceites esenciales de cítricos
		Raspado de pericarpio	
	Macerado	Lesiones mecánicas en cortezas	Resinas, bálsamos, aceites
Destilación	Directa o simple		Aceites esenciales y aguas aromáticas
	Arrastre con vapor de agua o indirecto		
	Destilación-maceración		
Extracción con solventes	Solventes volátiles		Resinoides alcohólicos
Técnicas de vanguardia	Extracción por microonda		Aumentan extracción y reducen el tiempo
	Extracción con fluido en estado supercrítico		

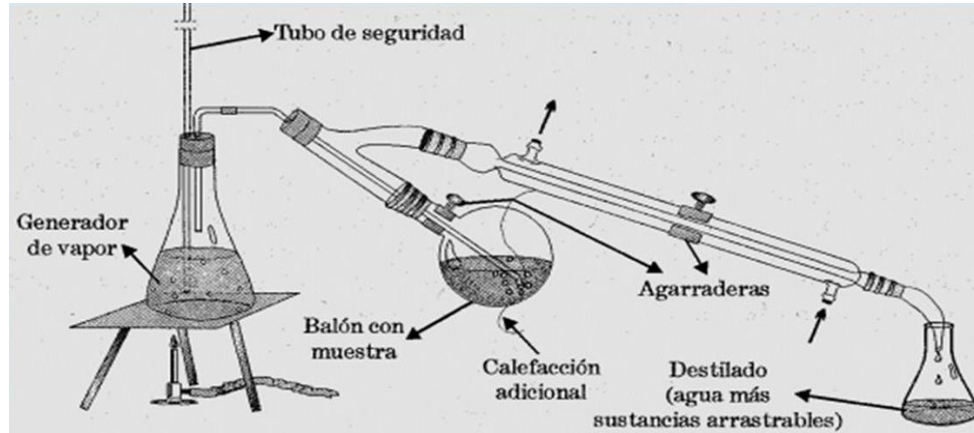
**Fuente:** (Albarracín & Gallo, 2003)

### Destilación por arrastre con vapor

Este proceso consiste en la destilación de dos líquidos inmiscibles entre sí, se lo realiza mediante el depósito de la materia vegetal fresca y troceada en un recipiente, al mismo tiempo que en otro recipiente se generan vapores de agua por aplicación de calor, estos vapores son inyectados en el material vegetal a través de un conducto que conecta ambos recipientes, arrastrando el aceite esencial en fase de vapor, el cual se condensa y vuelve a la fase líquida que es recogida en un recipiente, teniendo como resultado una mezcla de fases oleosa y acuosa, que pueden ser separadas por decantación y mediante un tratamiento con sulfato de sodio anhidro que permitirá eliminar el contenido de agua

remanente en el aceite (López et al., 2009). En la ilustración 1 se representa el ensamblado del equipo de destilación.

**Ilustración 1.** Destilación por arrastre con vapor



Fuente: (López et al., 2009)

#### 2.1.4 Conservación de los aceites esenciales

Cuando los aceites esenciales son almacenados de manera adecuada sin recibir luz directa del sol, ni calor y su exposición al ambiente es la menor posible, pueden llegar a durar hasta 5 años conservando sus propiedades de manera intacta (Vida, 2013).

#### 2.1.5 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

No está esclarecido un mecanismo de acción específico para los AEs debido a que son mezclas constituidas por diversos componentes, sin embargo, debido a su naturaleza lipofílica son comúnmente asociados a una acción sobre la pared celular, por lo que es probable que las bacterias Gram positivas sean más sensibles por sobre las Gram negativas, ya que la ausencia del espacio periplásmico en las bacterias Gram positivas podría facilitar la penetración de los componentes bioactivos de los AEs en el citoplasma y núcleo de la célula bacteriana (Armas, et al., 2011).

Algunos estudios aseguran que la actividad antimicrobiana también está relacionada a la concentración a la cual se exponen los agentes patógenos, de manera que, a bajas concentraciones se produce un efecto bacteriostático mediante la alteración al “quorum sensing”, donde las bacterias a través de constantes interacciones secretan “autoinductores” que incrementan sus factores de patogenicidad; a altas concentraciones se produce un efecto bactericida presumiblemente al interferir en la síntesis de proteínas,



reducción en los niveles de ATP, coagulación de proteínas en el citoplasma o variaciones en el pH que pueden afectar procesos metabólicos (Zekaria, 2008).

## 2.2 *Citrus limonia* (Limón mandarina)

### **Ilustración 2.** Planta de *Citrus limonia*



**Fuente:** Autores

El limón mandarina tiene sus orígenes en la India, siendo introducido a fines del siglo XIX a Estados Unidos y desde entonces extendidos hacia Medio Oriente, África y Europa (Restrepo, 2012).

El árbol de limón mandarina puede crecer hasta 3.5 metros de alto, tal como se muestra en la ilustración 2, posee tallos con una considerable cantidad de espinas que pueden medir hasta 1 cm de largo. Las hojas son elípticas de borde entero, las flores son pequeñas blancas o violáceas. El fruto es de color verde y liso en un principio luego se torna anaranjado y rugoso, posee epicarpio delgado, pulpa anaranjada con vesículas rellenas. Al fruto se lo conoce de diversas maneras, por ejemplo, limón mandarina, limón real, limón injerto, limón rugoso,, etc. (Stampella et al., 2013).

Stampella et al. (2013) clasifican taxonómicamente a *Citrus limonia* según la tabla 4.



**Tabla 4.** Clasificación taxonómica de *Citrus limonia* (limón mandarina)

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subreino</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Sapindales</i>
<b>Familia</b>	<i>Rutaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Citrus</i>
<b>Especie</b>	<i>Citrus limonia</i>

**Fuente:** (Stampella et al., 2013)

El clima adecuado para que *Citrus limonia* pueda perpetuar, es el tropical (23°C-24°C). No es exigente en cuanto a las condiciones del suelo, siempre y cuando tenga un buen drenaje, materia orgánica suficiente y una acidez (pH 6.1-6.7) (Restrepo, 2012).

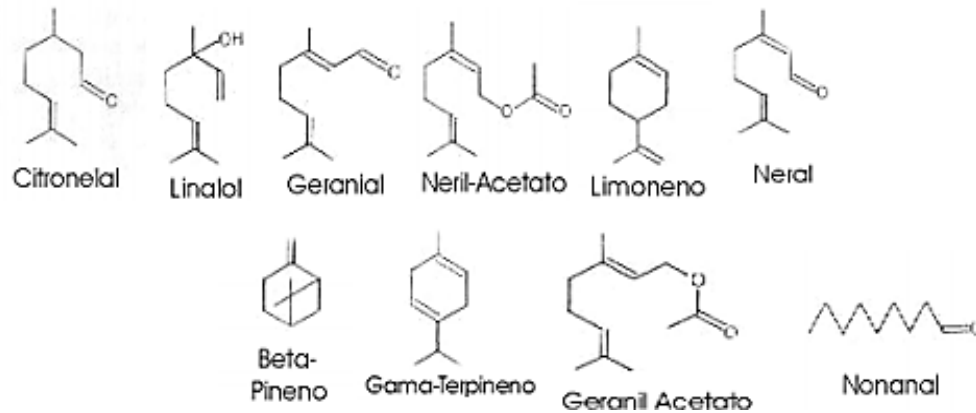
El aceite esencial de todos los cítricos constan en su mayoría de hidrocarburos no oxigenados como el limoneno; hidrocarburos oxigenados como linalol, entre otros (Navarrete et al., 2010). En la tabla 5 e ilustración 3 se presenta una clasificación de los componentes químicos de los aceites esenciales de la mayoría de los cítricos y su estructura química respectivamente.

**Tabla 5.** Composición química de los aceites esenciales de los cítricos

<b>Hidrocarburos</b>	Terpenos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\alpha</math>-Pineno (Trazas)</li> <li>• <math>\beta</math>-Pineno</li> <li>• Canfeno</li> <li>• <math>\beta</math>-Felandreno</li> <li>• <math>\alpha</math>-Terpineno</li> <li>• <math>\beta</math>-Terpineno</li> <li>• <math>\alpha</math>-Limoneno (Componente principal)</li> </ul>
	Sesquiterpenos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bisaboleno</li> <li>• Cadileno</li> </ul>
<b>Cetonas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metilheptenona</li> </ul>	
<b>Aldehídos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citral</li> <li>• Citronelal</li> <li>• Aldehídos octílico, nonílico, decílico y láurico</li> </ul>	
<b>Alcoholes y Ésteres</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\alpha</math>-Terpineol</li> <li>• Geraniol (en acetato)</li> <li>• Nerol (en acetato)</li> <li>• Antranilato de metilo</li> </ul>	
<b>Ácidos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acético</li> <li>• Cáprico</li> <li>• Láurico</li> </ul>	

**Fuente:** (Navarrete et al., 2010)

**Ilustración 3.** Estructura química de los componentes principales de los aceites esenciales de los cítricos



**Fuente:** (Cerutti & Neumayer, 2004)

Las altas tasas de vitamina C de *Citrus limonia* lo hacen adecuado para mantener fuerte el sistema inmunológico, además, su aceite esencial actúa como antibacteriano en casos de heridas cutáneas como el acné, incluso se piensa que puede ayudar para tratar la obesidad (Restrepo, 2012).

### 2.3 Clavo de olor (*Syzygium aromaticum*)

**Ilustración 4.** Flores secas de *Syzygium aromaticum*



**Fuente:** Autores

Se trata de un árbol de la familia *Myrtaceae* de origen Indonesio. Su nombre *clavo* se debe a que el botón floral tiene un parecido con este objeto, tal como se presenta en la ilustración 4, también se conocen como girofles. Sus orígenes se remontan a las Islas Molucas de

Indonesia en donde se limitaba su producción hasta el momento en que se dio a conocer al mundo (González & López, 2013).

El árbol del clavo mantiene su follaje durante todo el año y llega a crecer de 10 a 20 metros. Las flores en principio aparentan un color pálido, luego cambia hacia un verde y posteriormente se tornan de color rojizo, lo que indica que están listas para la cosecha. La flor posee un receptáculo (ovario) en el cual se disponen: 4 sépalos, 4 pétalos y algunos estambres (González & López, 2013).

González y López (2013) clasifican taxonómicamente al clavo de olor según la tabla 6.

**Tabla 6.** Clasificación taxonómica de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor)

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclase</b>	<i>Rosidae</i>
<b>Orden</b>	<i>Myrtales</i>
<b>Familia</b>	<i>Myrtaceae</i>
<b>Subfamilia</b>	<i>Myrtoideae</i>
<b>Género</b>	<i>Syzygium</i>
<b>Especie</b>	<i>Syzygium aromaticum</i>

**Fuente:** (González & López, 2013)

El árbol del *Syzygium aromaticum* puede perpetuar en zonas con clima cálido, suelo rico en materia orgánica con un buen drenaje (González & López, 2013).

En la composición química del aceite esencial de clavo de olor predomina el eugenol (72 - 90 %), el mismo que proporciona su aroma característico. También presenta otros componentes, los cuales se indican en el tabla 7 (Celis Urquiza ,2010).

**Tabla 7.** Composición porcentual del aceite esencial de *Syzygium aromaticum*

<b>Componente</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
2-Heptanona	0.93
Etil-hexanoato	0.72
Eugenol	84.02
Eugenol acetato	7.06
Ethyl octanoato	Tr
$\alpha$ -cubebeno	Tr

Linalol	Tr
2-Undecanona	0.1
$\beta$ -cayophyllene	1.31
Etil benzoato	Tr
$\alpha$ -Muroleno	Tr
Benzyl alcohol	0.23
Carvona	Tr
Humulenol	0.22
Calacoreno	0.14
Calameneno	0.13
Cadineno	0.1

\*Tr: trazas

**Fuente:** (Celis Urquiza, 2010)

El clavo de olor posee un aroma fuerte y delicioso, lo que lo hace uno de los principales componentes empleados en el arte culinario. También es utilizado como aromatizante de algunas formulaciones cosméticas y algunas bebidas (González & López, 2013).

La composición predominante en eugenol y trazas de salicilato de metilo lo hace muy empleado para tratar pequeñas dolencias dentales debido a su actividad anestésica. Es conocido además por sus propiedades antihelmínticas, así como antibacterianas y fungicidas (Celis Urquiza, 2010).

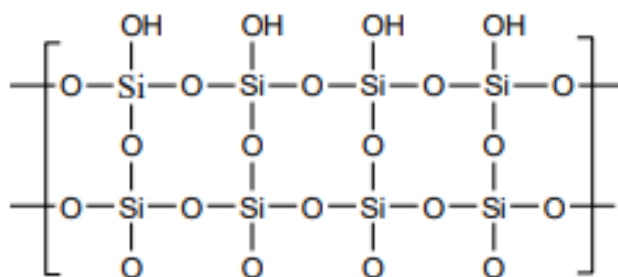
## 2.4 Cromatografía

La cromatografía es el proceso físico por el cual se pueden separar los constituyentes de una mezcla de sustancias en un tiempo determinado, distribuyendolos entre dos fases, una estacionaria o inmóvil y otra móvil en una dirección definida (Romero García, 2002).

### Cromatografía en fase normal (NPC)

Alude a una corrida cromatográfica en el que la fase estacionaria es polar debido a su matriz de alúmina, sílica o incluso estructurado por moléculas orgánicas, tal como se muestra en la ilustración 5, y la fase móvil es menos polar, de esta manera la fase estacionaria al poseer sitios polares permite separar al analito de acuerdo al grupo activo (Henríquez, 2017).

**Ilustración 5.** Estructura molecular de la sílica en fase estacionaria normal

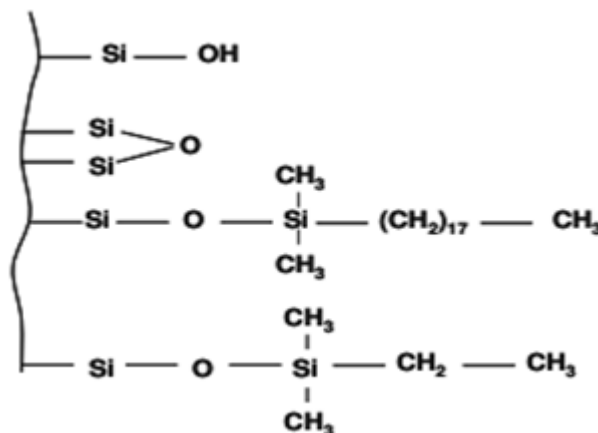


Fuente: (Henríquez, 2017)

### Cromatografía en fase reversa (RPC)

El principio es similar al de cromatografía en fase normal, difiriendo en la estructura de la fase estacionaria, ya que su matriz consiste en sílica modificada con compuestos hidrofóbicos (hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos), tal como se muestra en la ilustración 6, como resultado la fase es apolar y por lo tanto requiere de una fase móvil más polar (Henríquez, 2017).

**Ilustración 6** Matriz apolar de la fase estacionaria



Fuente: (Henríquez, 2017)

### 2.5 Cromatografía en capa fina (TLC)

Corresponde a una cromatografía en fase normal (NPC) del tipo líquido-sólido, cuyo mecanismo de operación se basa en un proceso de adsorción, es decir, en el que la fase móvil puede ser un disolvente o una mezcla de estos, mientras que la fase estacionaria se trata de un adsorbente dispuesto uniformemente sobre un soporte en el cual quedarán retenidos los analitos separados, fenómeno conocido como retención. La TLC permite

manejar una estrecha relación en cuanto a la polaridad, así, el eluyente que se requiera emplear será menos polar que la fase estacionaria de modo que los analitos con grupos funcionales más polares alcanzarán velocidades de desplazamiento mayores, en la tabla 8 se muestra una representación del orden creciente de polaridad de los grupos funcionales de los compuestos orgánicos (Romero García, 2002).


**Tabla 8.** Orden creciente de polaridad de grupos funcionales de compuestos orgánicos

Grupos funcionales	
<div><div>Aumento de polaridad ↑</div><div>Ácidos carboxílicos</div><div>Aminas</div><div>Fenoles</div><div>Amidas</div><div>Alcoholes</div><div>Ésteres = Aldehídos = Cetonas</div><div>Éteres</div></div>	<div>Éteres</div> <div>Sulfuros</div> <div>Cloroalcanos = H. aromáticos</div> <div>Alquenos</div> <div>Alcanos</div>

**Fuente:** (Waksmundzka, et al., 2008)

Según Waksmundzka et al. (2008), los grupos funcionales de los compuestos orgánicos suelen formar asociaciones moleculares con las bases polares de la fase estacionaria, de esta manera la retención del analito se incrementa proporcionalmente al aumento de su polaridad, en la tabla 9 se presenta un orden creciente de las bases polares de algunas fases estacionarias.

**Tabla 9.** Orden creciente de polaridad de las bases polares de fases estacionarias

Fases estacionarias	
<b>Aumento de polaridad</b> 	Cianopropil
	Diol
	Aminopropilo
	Silicio = alúmina


**Fuente:** (Waksmundzka, et al., 2008)

La polaridad de la sílica gel la hace el adsorbente de elección para el análisis de compuestos orgánicos como los aceites esenciales, ya que gracias a sus grupos silanol, asegura una fuerte retención de los analitos (UCDAVIS, 2019).

### **Elección de la fase móvil**

Al momento de escoger una fase móvil se deben tener en cuenta varios factores como: costo, pureza, volatilidad, miscibilidad, fuerza de elución y polaridad (UNAM, 2007; Waksmundzka, et al., 2008), en la tabla 10 se presenta el orden creciente de polaridad de los eluyentes más empleados en TLC según revisiones bibliográficas.

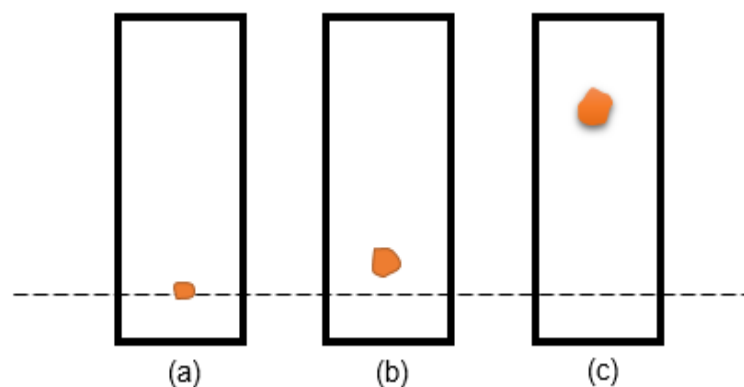
**Tabla 10.** Orden creciente de polaridad de fases móviles más empleadas

Fases móviles		
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Aumento de polaridad</p> 	Agua	} <b>Polares</b>
	Ácido acético	
	Etanol	
	Metanol	} <b>Medianamente Polares</b>
	Acetato de etilo	
	Cloroformo	
	Acetona	} <b>Apolares</b>
	Benceno	
	Éter de petróleo	
	n- hexano	

**Fuente:** (UNAM, 2007)

La relación de polaridad entre la fase móvil, la estacionaria y los analitos, requiere que la elección del eluyente sea de manera empírica, tal como se presenta en la ilustración 7 hasta obtener resultados aceptables, (UNAM, 2007).

**Ilustración 7.** Representación de la elección empírica de la fase móvil



**Fuente:** Autores

### Miscibilidad

Es la capacidad que tienen algunas sustancias para formar una disolución en cualquier proporción. Este parámetro juega un rol de suma importancia a la hora de utilizar una



mezcla de fases móviles ya que para la corrida cromatográfica se precisa de una fase móvil homogénea (Chaca Palango, 2018).

### Número de miscibilidad (M)

La capacidad que tienen los solventes de lograr la uniformidad se encuentra representado por los números M. En el anexo 1 se presenta una clasificación de los solventes más empleados en TLC con sus respectivos números M. Con este parámetro es posible predecir la miscibilidad de dos solventes, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$M_{AB} = M_A - M_B$$

Donde:

- $M_A$  = número de miscibilidad mayor
- $M_B$  = número de miscibilidad menor

Interpretación:

- 15 o menos, los solventes serán miscibles a cualquier proporción a 15°C.
- 16, los solventes son miscibles de 25°C a 75°C.
- 17 o más, los solventes son inmiscibles entre sí (Cientisol, 2014).

### Elección del revelador

Para la fase de revelado se puede escoger empíricamente entre técnicas químicas como vainillina y anisaldehído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; o físicas como la luz UV (Skoog et al., 2001).

### Corrida cromatográfica

El desarrollo de la corrida cromatográfica consiste en sembrar en uno de los extremos de la fase estacionaria la muestra a analizar, así, al ponerla en contacto con la fase móvil, ésta ascenderá por capilaridad arrastrando y separando los analitos, los cuales quedarán retenidos en el lecho inmóvil y se revelarán mediante fenómenos físicos o químicos (UNAM, 2007).

### **Factor de retención ( $R_f$ )**

El  $R_f$  nos indica el tiempo en el cual el analito se sitúa en la fase estacionaria acorde al tiempo que permanece en la fase móvil. El valor del  $R_f$  suele tener una variación de  $\pm 20\%$  por lo que es recomendable realizar duplicados de la prueba (UNAM, 2007).

### **Factores que influyen en Cromatografía de Capa Fina**

La variación en la caracterización colorimétrica y el cálculo de los  $R_f$  se debe principalmente a los siguientes factores:

- Temperatura: los analitos eluyen con mayor fuerza a menor temperatura.
- Inocuidad de las placas: evitan interferencias en la elución.
- Cantidad sembrada: aumentos de muestra incrementan los valores de  $R_f$ .
- Fase estacionaria: calidad, pureza, espesor de la fase y activación de la placa.
- Fase móvil: calidad y pureza de los solventes.
- Naturaleza de la mezcla: muchos constituyentes interfieren en la identificación colorimétrica (Sánchez, 2010).

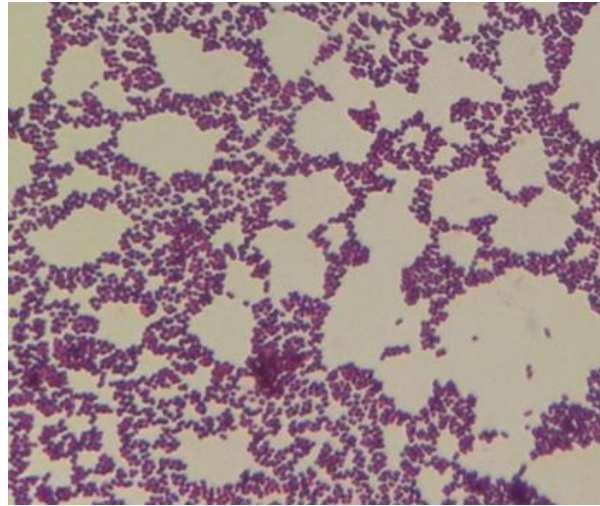
### **2.6 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* durante mucho tiempo se ha caracterizado por ser un microorganismo causante de patogenicidad en el ser humano, destacando entre sus tantas afecciones la bacteriemia, infección del SNC, afecciones cutáneas y de tejidos blandos. Debido a su singularidad de encontrarse en muchos lugares con una prevalencia considerable en insumos e instrumental médico, se ha considerado como un organismo de interés clínico en infecciones nosocomiales. Suele habitar zonas húmedas del cuerpo como axilas, pliegues inguinales y en especial el vestíbulo nasal anterior (Gil, 2000).

### **Morfología microscópica**

Se trata de cocos Gram positivos de 0.8 a 1.5 micras de diámetro, se presentan en forma individual, pares, tétradas, cadenas y en racimos (Zendejas, Ávalos, & Soto, 2014), en la ilustración 8 se muestra una tinción de Gram de *S. aureus* en su forma racimal.

**Ilustración 8.** Tinción de Gram de *Staphylococcus aureus*. Vista en microscopio óptico con aumento de 100x

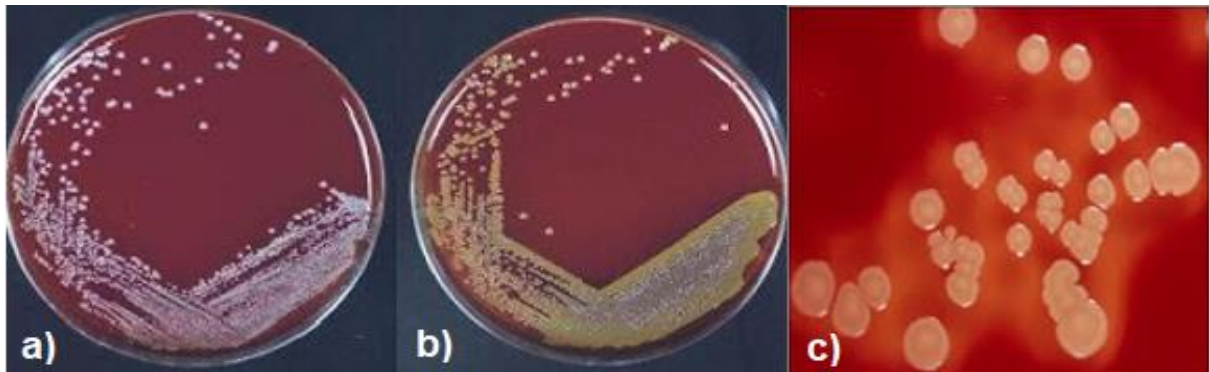


**Fuente:** Autores

### Morfología macroscópica

Las colonias de *S. aureus* son lisas, de borde definido, ligeramente convexas, de 1 a 3 mm de diámetro, blanquecinas o amarillas (24 - 48h de incubación), éste último es la razón por la que también se lo conoce como Estafilococo dorado. Cultivado en agar con sangre desfibrinada de cordero al 5% se puede apreciar zonas de beta hemólisis, tal como se muestra en la *Ilustración 9* (Zendejas et al., 2014).

**Ilustración 9.** *S. aureus* cultivado en agar sangre enriquecido con sangre de cordero al 5% a 37°C: a) 24 horas; b) 48 horas; c) zonas de beta hemólisis alrededor de las colonias.



**Fuente:** (Silva, 2007)

En la tabla 11 se presentan algunos factores de patogenicidad de *S. aureus* los cuales se encuentran clasificados en 3 grupos.

**Tabla 11.** Factores de patogenicidad de *Staphylococcus aureus*

Factores de patogenicidad	Propiedades
<b>Componentes de la pared celular</b>	
Peptidoglicanos Ácidos teicoicos Proteína A Cápsula mucoide	Activación del complemento Antifagocítica Antifagocítica Adherencia
<b>Enzimas</b>	
Coagulasa Estafiloquinasas Hialuronidasa Lipasas	Formación de absceso Destrucción del coágulo Invasión hística Colonización
<b>Toxinas</b>	
Hemolisinas Leucocidina Exfoliatinas Toxina del shock tóxico Enterotoxinas	Rotura de la membrana celular Altera la permeabilidad celular de fagocitos Epidermólisis Shock tóxico Intoxicación alimentaria

**Fuente:** (Zendejas et al., 2014)

### Factores predisponentes

Las afecciones ocasionadas por *S. aureus* también están condicionadas por alteraciones en el sistema inmunológico del huésped, como: modificación en la quimiotaxis leucocitaria, lesiones cutáneas y enfermedades crónicas (Zendejas et al., 2014).

### Patogenia

*S. aureus* tiene la capacidad de afectar al organismo a través de invasión directa, diseminación sanguínea o por acción de toxinas según lo indica la tabla 12.

**Tabla 12.** Infecciones ocasionadas por *Staphylococcus aureus*

<b>Invasión directa</b>	Superficial	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Piodermas</li> <li>- Infección de piel y tejidos blandos</li> </ul>
	Profunda	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Artritis séptica</li> <li>- Osteomielitis</li> <li>- Pioniositis</li> </ul>
<b>Diseminación por vía sanguínea</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bacteriemia con o sin shock o falla multiorgánica</li> <li>- Abscesos metastásicos (cerebro, pulmón, hígado, etc.)</li> </ul>	
<b>Enfermedad mediada por toxinas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Síndrome de piel escaldada</li> <li>- Intoxicación alimentaria</li> <li>- Síndrome del shock tóxico</li> </ul>	

**Fuente:** (Zendejas et al., 2014)

## 2.7 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Se ha comprobado que los aceites esenciales tienen una considerable actividad antimicrobiana contra diversos patógenos, sin embargo, la metodología empleada en su evaluación no está del todo establecida, principalmente debido a que sus propiedades químicas suelen causar interacciones con las bases prácticas de cada método. Hoy en día existen diversos procesos que permiten determinar la actividad bacteriostática o bactericida de estos compuestos, permitiendo clasificarlos en base a una exposición directa y en fase de vapor, tal como se presenta en la tabla 13 y tabla 14 respectivamente (Reyes et al., 2014).

**Tabla 13.** Métodos de determinación de actividad antimicrobiana de aceites esenciales por contacto directo

Método	Variaciones	Fundamento
<b>Difusión en agar</b>	Discos de papel	Discos de papel filtro impregnados en una concentración conocida de AE se ponen en contacto con la cepa, evidenciando zonas de inhibición
	Inoculación	Perforaciones en el agar con la cepa son inoculadas con concentraciones conocidas de AE, evidenciando zonas de inhibición.
<b>Dilución en agar</b>	Macrodilución	Diluciones seriadas del AE con caldo son añadidos a tubos de 1 a 10 ml en los que se inocula un número constante de células bacterianas, la presencia de turbidez reflejan el crecimiento del microorganismo.
	Microdilución	Diluciones crecientes del AE con caldo son añadidos a pocillos de 500ul en los que se inocula un número constante de células bacterianas, la presencia de turbidez reflejan el crecimiento del microorganismo.

**Fuente:** (Reyes et al., 2014)

**Tabla 14.** Métodos de determinación de actividad antimicrobiana de aceites esenciales en fase de vapor

Método	Fundamento
<b>Caja Petri invertida</b>	La cepa inoculada en el agar es incubada de forma invertida con un papel filtro embebido en una concentración conocida de AE diluido colocado en la cara interna de la tapa. La CMI se basa en la menor concentración en que los vapores inhiben el crecimiento bacteriano.
<b>Cámaras herméticas</b>	Consiste en crear atmósferas con vapores de AE de concentración conocida dentro de una cámara en la cual se depositan agares inoculados, evidenciándose la disminución del crecimiento, zonas de inhibición o reducción del número de colonias

**Fuente:** (Reyes et al., 2014)

### **2.7.1 Difusión en agar por discos de papel o método de Kirby Bauer modificado**

El aceite esencial impregnado en los discos de papel se va a difundir en el agar donde se encuentra sembrada la cepa bacteriana, inhibiendo así su crecimiento, el cual se evidencia a través de la formación de zonas de inhibición en función de la concentración empleada. La difusión en agar es un método muy reproducible, sin embargo, no es aplicable a todos los aceites esenciales. (Reyes et al., 2014).

### **Volatilidad**

La evaporación de los componentes durante el periodo de incubación, descartan a aquellos aceites esenciales que se volatilizan rápidamente, por lo que únicamente son aplicables a este procedimiento esencias con índice de volatilidad intermedio e inferior (Ramírez & Marín, 2012).

### **Hidrofobicidad**

La naturaleza de los AEs no siempre permite una completa interacción con la fase acuosa del medio de cultivo, por ende, la difusión de los compuestos en el agar se complica, sin embargo, el uso de polisorbatos permiten mezclar aquellas sustancias que normalmente no son miscibles entre sí debido a su propiedad emulgente (Ramírez & Marín, 2012).

### **2.7.2 Macrodilución en caldo**

La dilución en agar y dilución en caldo son las principales técnicas empleadas en la valoración de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) siendo indicadores condicionales en la determinación del potencial de los agentes antimicrobianos, englobando antibióticos y sustancias que “destruyen” (actividad bactericida) o inhiben el crecimiento visible (actividad bacteriostática) de ciertos microorganismos. En el diagnóstico de laboratorio, la macrodilución en caldo, es un método poco utilizado más que en casos especiales asociados a patologías como artritis, osteomielitis, endocarditis, entre otras, sin embargo, a nivel investigativo es un método clave, ya que permite determinar la actividad antimicrobiana de compuestos de origen orgánico y sintético frente a nuevos patógenos (Picazo, 2000; Ramirez & Marín, 2009).

La prueba de macrodilución consiste en una serie de tubos que va a contener diluciones seriadas del extracto de las plantas a estudiarse en donde se inocula posteriormente el microorganismo a testear; se evalúa visualmente la presencia de turbidez como indicador



de crecimiento bacteriano tras la incubación de los tubos para la determinación de la CMI (Ramirez & Marín, 2009).

### **Concentración mínima inhibitoria (CMI)**

Determina la mínima concentración de un antimicrobiano (en  $\mu\text{g/mL}$ ) capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana luego de la incubación en condiciones estandarizadas. Se considera una “prueba de oro” ya que se utiliza como una confirmación cuando existe de por medio pruebas preliminares de susceptibilidades antimicrobiana cuyos resultados son indeterminados (Horna Quintana et al., 2005).

### **Concentración mínima bactericida (CMB)**

Determina la mínima concentración a la que un antimicrobiano puede matar una cepa bacteriana. El principio de la metodología es similar a la utilizada para determinar la CMI por dilución en caldo con sus respectivas modificaciones para bacterias nutricionalmente exigentes (Horna Quintana et al., 2005).

La CMI y CMB de los antimicrobianos se encuentran muy cercanas, difiriendo sus resultados en una o dos diluciones. Cuando esto no se cumple, se presentan los fenómenos de tolerancia, prevalencia y paradójica de Eagle (Picazo, 2000).

### **Tolerancia**

Permite determinar la reducción o ausencia de la capacidad bactericida de una sustancia frente a un microorganismo específico. Aludiendo a la necesidad de adicionar otro compuesto con propiedades antimicrobianas (Picazo, 2000).

### **Persistencia**

Fenómeno que se presenta cuando la cepa bacteriana se resiste a la acción del antimicrobiano. Presente en el 0.1% de los casos, razón de que la CMB representa la eliminación del 99% de la cepa bacteriana (Picazo, 2000).

### **Fenómeno paradójico de Eagle**

Disposición de un elevado número de bacterias en concentraciones mayores a la concentración mínima bactericida (Picazo, 2000)



## CAPÍTULO 3

### METODOLOGÍA

#### 3.1 Tipo de investigación

La presente investigación es de tipo exploratorio y cuasi-experimental.

#### 3.2 Ubicación

Los análisis fitoquímico y microbiológico se realizaron en los laboratorios de Farmacognosia, Análisis Biológico y Microbiología de Alimentos de la Universidad de Cuenca, ubicada en la ciudad de Cuenca, Provincia del Azuay; latitud: 2°54'2.49"S longitud: 79° 0'36.42"O.

Los frutos de *Citrus limonia* fueron obtenidos en el Recinto de La Unión del cantón Santo Domingo de los Colorados, Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas; latitud: 0°16'59.88"S longitud: 79°13'22.86"O según se observa en la ilustración 10.

**Ilustración 10.** Recinto la Unión, Cantón Santo Domingo de los Colorados, Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.



**Fuente:** Google Earth

Las flores secas de *Syzygium aromaticum* fueron recolectadas de cinco centros de abasto ubicado en los alrededores del “Mercado 10 de Agosto” de la Ciudad de Cuenca, Provincia del Azuay; latitud: 2°53'56.99"S longitud: 79° 0'27.44"O, según se observa en la ilustración 11.

**Ilustración 11.** Mercado “10 de Agosto”, Ciudad de Cuenca, Provincia del Azuay



Fuente: Google Earth

### 3.3 Obtención y procesamiento de la materia prima

#### Recolección

Los frutos fueron recolectados procurando que no entren en contacto en ningún momento con el suelo, colocando los mismos en una bolsa de malla (saquillo) limpia y aireada hasta su traslado al lugar de procesamiento. La recolección se realizó de forma ecológica y manual, utilizando un gancho para las partes elevadas del árbol, considerando las directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales (OMS, 2003).

Se identificaron 5 centros de abastos disponibles para la venta de clavo de olor al granel en los alrededores del mercado “10 de Agosto”, de los cuales se tomaron 200 g de muestra por cada lugar, según la NTON-17002-02 “Norma de Procedimiento para Muestreo de Productos Vegetales”, ver anexo 2 (NTON-17002, 2002). La muestra obtenida se etiquetó y se transportó al laboratorio para su procesamiento, evitando el sub - empaquetamiento durante su traslado. En el laboratorio se mezclaron las muestras recolectadas y se extrajo continua y aleatoriamente porciones de muestra hasta completar la cantidad requerida para la extracción del aceite esencial (Romero Mares, 2019).

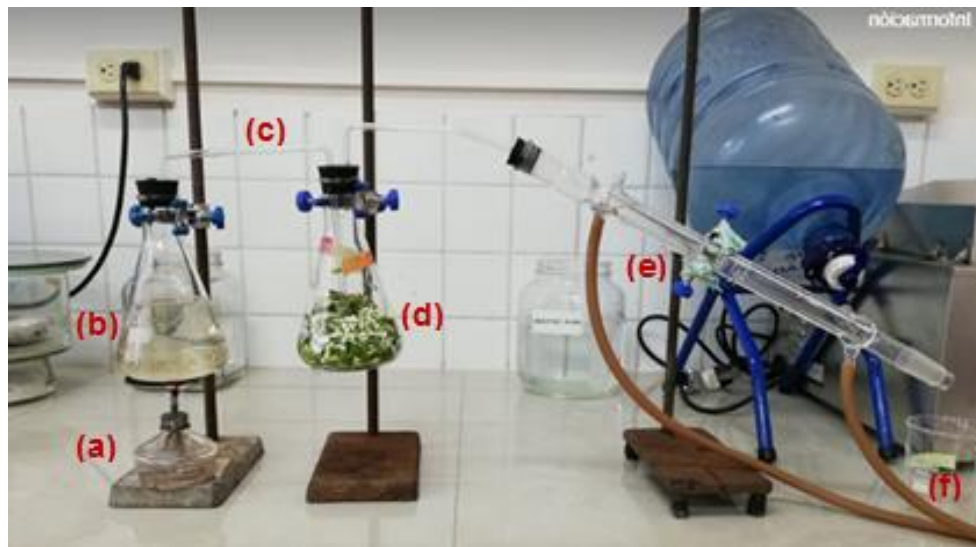
### Procesamiento pre-extracción

Se seleccionaron frutos frescos de *Citrus limonia* desechando aquellos con golpes o daños visibles, para *Syzygium aromaticum* se procedió a retirar sustancias extrañas tales como ramas, piedras, tierra, etc.; se lavaron con agua corriente y con agua destilada; una vez secas las muestras se retiró todo el epicarpio de los frutos de *Citrus limonia* con ayuda de un rallador sanitizado, mientras que las flores secas de *Syzygium aromaticum* se trituraron con ayuda de un procesador de alimentos (Ruiz Alonso 2008).

### 3.4 Extracción de los aceites esenciales de *Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum* mediante destilación por arrastre de vapor

La extracción de los aceites esenciales se llevó a cabo por medio del método de arrastre de vapor. Se destiló por réplica aproximadamente 0.3 Kg de cada muestra vegetal. El equipo fue ensamblado según las indicaciones establecidas por Ruiz Alonso (2008) tal como se muestra en la ilustración 12, tomando en cuenta la importancia fundamental del sello hermético en el paso del vapor desde el matraz generador hasta la materia vegetal.

**Ilustración 12.** Ensamblaje del equipo de destilación por arrastre de vapor



Detalle de literales: (a) mechero; (b) matraz 1: generador de vapor; (c) tubos conectores; (d) matraz 2: materia vegetal; (e) condensador; (f) vaso de precipitación: recolector.

**Fuente:** Autores

Luego de la separación del aceite esencial de la fase acuosa, se procedió a su deshidratación con sulfato de sodio anhidro, se centrifugó a 2500 r.p.m por 5 minutos para separar el aceite esencial del remanente de agua y finalmente se almacenó en un tubo de vidrio con cierre hermético en refrigeración hasta su posterior uso (Ruiz Alonso 2008).

Para determinar el porcentaje de rendimiento en aceite esencial se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso del producto (g)}}{\text{Peso de la materia prima (g)}} \times 100$$

El peso del producto alude al peso del AE, el cual se obtuvo despejando la masa de la fórmula de la densidad, de la siguiente manera:

$$m = \rho \times V$$

La determinación de la densidad relativa y absoluta de los aceites esenciales se realizó mediante el método del picnómetro a 20°C según especificaciones de la norma ISO 279:1998 (ISO, 1998), utilizando la siguiente fórmula:

$$\rho_R = \frac{M1 - M}{M2 - M1}$$

Donde:

- M: Peso del picnómetro vacío (g)
- M1: Peso del picnómetro junto con la muestra (g)
- M2: Peso del picnómetro con agua (g)

### **3.5 Determinación cualitativa de los principales metabolitos secundarios presentes en los aceites esenciales de *Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum* mediante cromatografía en capa fina (TLC)**

Para la determinación de los metabolitos secundarios de los aceites esenciales de *Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum* se utilizaron placas TLC de sílica gel 60 F254 MERCK® como fase estacionaria; para la elección de la fase móvil se probaron diferentes eluyentes según indicaciones de "*Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*", determinando para *Citrus limonia*: tolueno:acetato de etilo (85:15), y para *Syzygium*

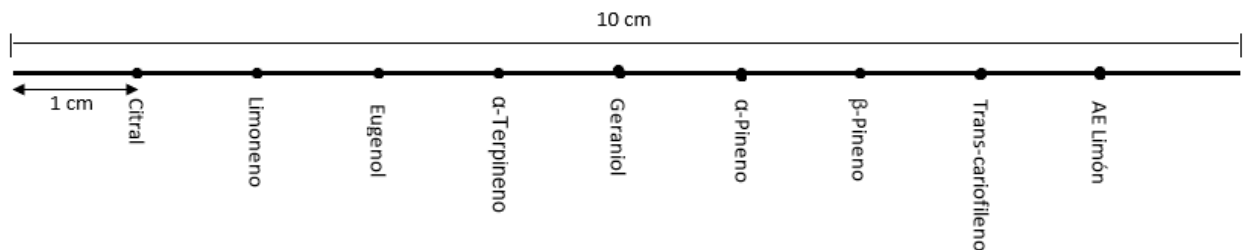
*aromaticum*: tolueno. Como revelador se utilizó anisaldehído-ácido sulfúrico. Los patrones empleados en este estudio fueron provistos por el “Proyecto de plantas medicinales del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca”. En la corrida cromatográfica del aceite esencial de *Citrus limonia* se utilizaron los patrones mencionados en la tabla 15, empleando el modelo de siembra indicado en la ilustración 13.

**Tabla 15.** Patrones empleados en TLC frente al aceite esencial de *Citrus limonia*

Lista de patrones
Citral 10 mg/ml en metanol
Limoneno 10 mg/ml en metanol
Eugenol 5 mg/ml en metanol
$\alpha$ -Terpineno 5 mg/ml en cloroformo
Geraniol 5 mg/ml en metanol
$\alpha$ -Pino 5 mg/ml en metanol
$\beta$ -Pino 5 mg/ml en metanol
Trans-cariofileno 5 mg/ml en cloroformo

**Fuente:** Autores

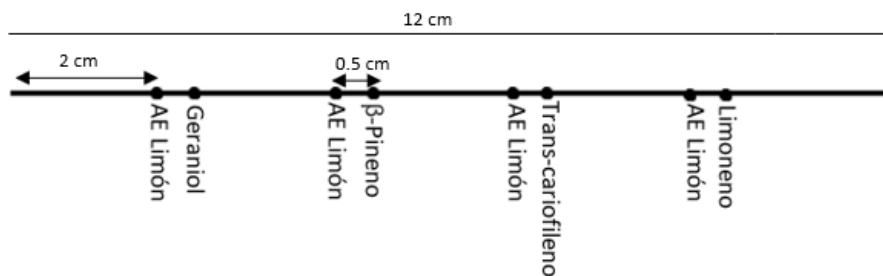
**Ilustración 13.** Modelo de siembra de patrones y aceite esencial de *Citrus limonia* en la fase estacionaria



**Fuente:** Autores

La confirmación del Geraniol,  $\beta$ -Pino y trans-cariofileno se realizó usando corrida cromatográfica en fase normal y en fase reversa, para lo cual se empleó el modelo de siembra indicado en la ilustración 14.

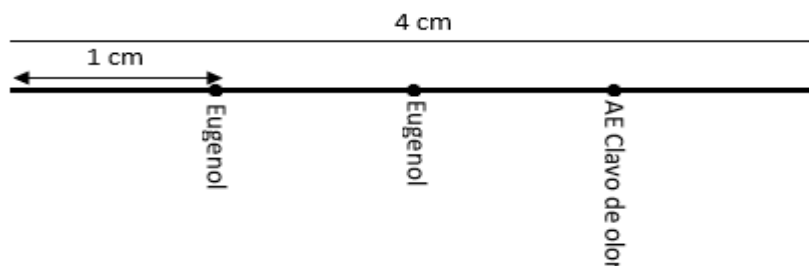
**Ilustración 14.** Modelo de siembra de patrones y aceite esencial de *Citrus limonia* para la TLC confirmatoria en fase normal y fase reversa



**Fuente:** Autores

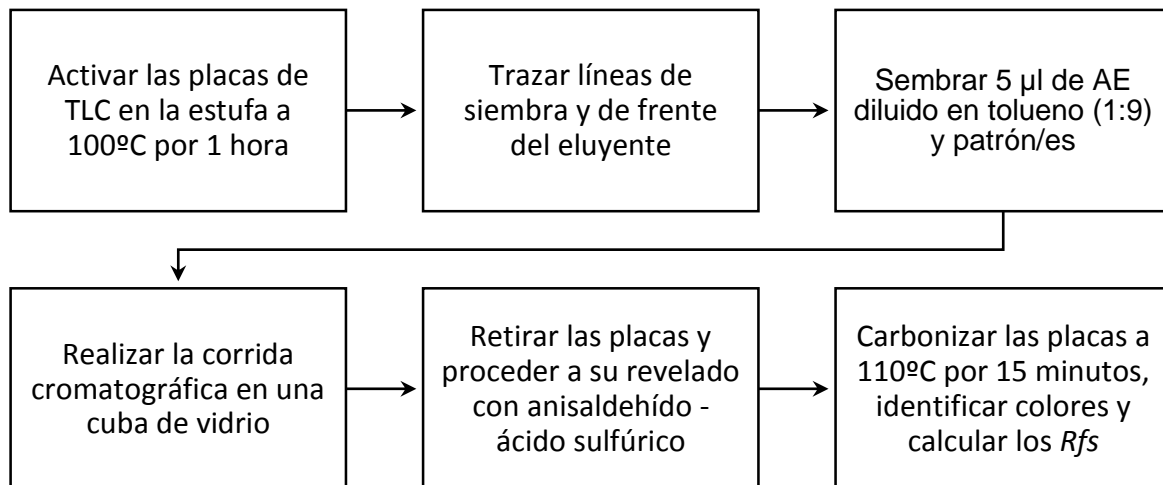
La corrida cromatográfica del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* se realizó frente a un patrón de Eugenol de 5 mg/ml en metanol; cuya siembra se indica en la ilustración 15.

**Ilustración 15:** Modelo de siembra de patrones y muestra de AE para la corrida cromatográfica de *Syzygium aromaticum*



**Fuente:** Autores

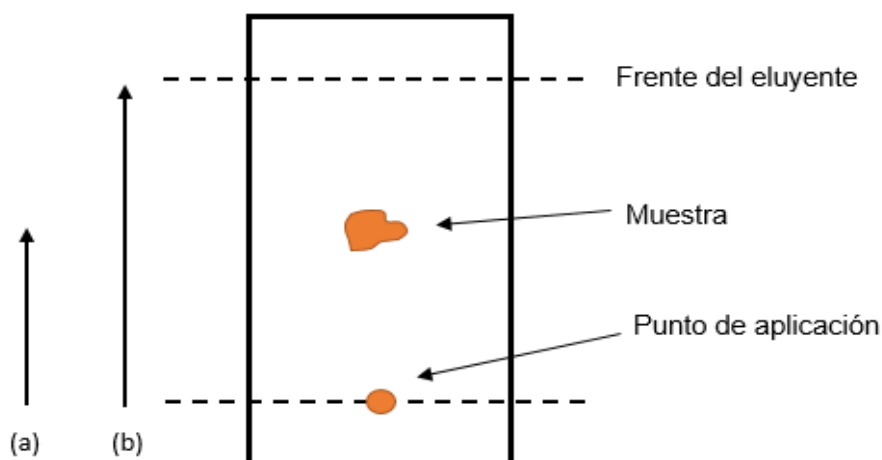
Para realizar la TLC de los aceites esenciales extraídos se procedió según se indica en el esquema 1

**Esquema 1.** Flujograma de TLC

**Fuente:** (Wagner & Blatt, 1996)

El cálculo de los factores de retención ( $R_f$ s) se realizó de acuerdo al esquema presentado en la ilustración 16, la fórmula empleada fue la siguiente:

$$R_f = \frac{(a) \text{ Distancia recorrida por el analito desde el punto de aplicación}}{(b) \text{ Distancia recorrida por la fase móvil hasta el frente del eluyente}}$$

**Ilustración 16.** Representación del cálculo del factor de retención

**Fuente:** Autores



Los cromatogramas obtenidos se presentan en el anexo 3.

### **3.6 Actividad antimicrobiana y estimación de la CMI y CMB de los aceites esenciales de *Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Para determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, en primera instancia se realizó una prueba de screening empleando el método estandarizado de difusión en agar por disco, el cual está referenciado en el manual M02 del CLSI (2005) con el objetivo de establecer la concentración máxima a emplear en la estimación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de macrodilución en caldo; y la concentración mínima bactericida (CMB) mediante un subcultivo en agar Mueller Hinton de los tubos en los que no se observó crecimiento luego de 18 horas de incubación según indica el manual M07 - A10 (CLSI, 2015).

#### **3.6.1 Método de difusión en agar por disco**

Para realizar la prueba de sensibilidad antimicrobiana por difusión en agar, se utilizó un cultivo fresco de la cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 incubada a 37°C por 18 a 24 horas antes de su respectivo uso.

Se cortaron discos de papel filtro estándar de 6 mm de diámetro y se esterilizaron mediante calor húmedo a 121°C por 15 minutos a una atmósfera de presión en un autoclave (Reyes et al., 2014).

Se estandarizó el inóculo bacteriano suspendiendo de 1 a 2 unidades formadoras de colonias (UFC) en 5 ml de solución salina al 0.9%, se determinó la turbidez en un densitómetro ajustando a 0.5 en la escala de Mc Farland equivalente a  $1.5 \times 10^8$  UFC de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, posteriormente se procedió a realizar la siembra por estría en ángulo recto sobre una placa de agar Mueller Hinton (MH) de 5mm de espesor cubriendo completamente la superficie del agar (Cavalieri, et al., 2005).

Se prepararon diferentes diluciones de AEs con agua destilada y Tween 20 esterilizados por calor húmedo, según se indica en la tabla 16, posteriormente se procedió a la emulsificación.



**Tabla 16.** Diluciones seriadas (% v/v) del Aceite Esencial (AE) con Tween 20 al 2%

Dilución AE (% v/v)	AE $\mu$ l	H <sub>2</sub> O $\mu$ l	Tween 20 $\mu$ l
100	100	-	-
80	80	18	2
60	60	38	2
40	40	58	2
20	20	78	2
10	10	88	2
5	5	93	2
2.5	2.5	95.5	2

**Fuente:** (Pardo et al., 2017)

Se impregnaron 5  $\mu$ l de las diluciones de AE sobre cada disco y se colocaron sobre la superficie del agar Mueller Hinton (AMH) previamente inoculado con la cepa de *S. aureus*, presionando levemente para su correcta adhesión. Se procedió a incubar las placas invertidas a 37°C por 24 horas, realizando la prueba por triplicado (Pardo et al., 2017). La metodología empleada fundamenta su técnica en el Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana indicadas por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (Cavalieri, et al., 2005).

Una vez culminado el tiempo de incubación se retiraron las placas de la estufa y se procedió a examinarlas individualmente verificando la presencia de zonas de inhibición de crecimiento bacteriano visualizándose de mejor manera al contrastar las placas contra una superficie oscura, se midió el diámetro las zonas de inhibición los cuales se reportaron en milímetros (Cavalieri, et al., 2005). Los resultados de la prueba de difusión en agar mediante discos de sensibilidad se presentan en el anexo 4.

### 3.6.2 Macrodilución en caldo

Partiendo de los resultados obtenidos en la prueba de difusión en agar se ensayó el método de macrodilución en caldo empleando para ello una batería de 10 tubos, los cuales contenían diluciones seriadas de AE (0.01% - 10% *Citrus limonia*; 0,007% - 5% *Syzygium aromaticum*) en caldo Mueller Hinton (CMH) acondicionado con tween 20 a una concentración final de 0.5% (v/v) en donde se inoculó la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 previamente estandarizada a  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL y diluida en caldo hasta

alcanzar una concentración bacteriana de  $5 \times 10^5$  UFC/mL (según recomienda la NCCLS) aproximadamente luego de su incorporación a cada una de las diluciones de AE. Se añadió también un tubo de control de crecimiento y otro como control de esterilidad (CLSI, 2015).

Para realizar el seriado de las diluciones de los AEs, en primera instancia se preparó una solución stock de AE en CMH/0.5% Tween 20, a continuación se procedió como indica la tabla 17.

S. stock de AE de *Citrus limonia* 40 % (v/v): 2000 ul AE + 3000 ul CMH

S. stock de AE de *Syzygium aromaticum* 20 % (v/v): 1000 ul AE + 4000 ul CMH

**Tabla 17.** Diluciones seriadas del AE de *Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum* para la prueba de macrodilución en caldo

Diluciones seriadas de AE de <i>Citrus limonia</i>						Diluciones seriadas de AE de <i>Syzygium aromaticum</i>				
N°	Fuente	Volumen (ul)	+	Volumen CMH (ul)	[CI] (%v/v)	Fuente	Volumen (ul)	+	Volumen CMH (ul)	[CI] (%v/v)
1	S. Stock	500		500	20	S. Stock	500		500	10
2	S. Stock	500		1500	10	S. Stock	500		1500	5
3	S. Stock	500		3500	5	S. Stock	500		3500	2,5
4	3	500		500	2,5	3	500		500	1,2
5	3	500		1500	1,2	3	500		1500	0,6
6	3	500		3500	0,6	3	500		3500	0,3
7	6	500		500	0,3	6	500		500	0,15
8	6	500		1500	0,15	6	500		1500	0,07
9	6	500		3500	0,07	6	500		3500	0,03
10	9	500		500	0,03	9	500		500	0,01

\* CMH: Caldo Mueller Hinton

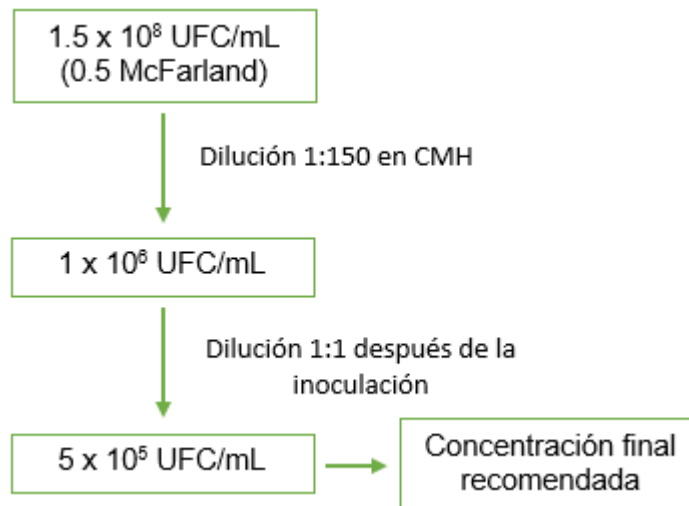
\* [CI]: Concentración inicial

**Fuente:** Autores

## Preparación del inóculo bacteriano

Tras la estandarización del inóculo bacteriano a una concentración aproximada de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml se procedió a la dilución del mismo como indica en el esquema 2.

### Esquema 2. Dilución del inóculo bacteriano



Fuente: Autores

La incorporación del inóculo se llevó a cabo como se indica en la tabla 18. Posterior a esto los tubos se incubaron a  $37^\circ\text{C} \pm 2$  durante 18 horas.

**Tabla 18.** Incorporación del inóculo bacteriano a las diluciones de AEs.

Incorporación del inóculo de <i>S. aureus</i>					
Diluciones seriadas de AE de <i>Citrus limonia</i>			Diluciones seriadas de AE de <i>Syzygium aromaticum</i>		
Tubos con dilución de AE (1000 ul c/u)	Volumen de inóculo (ul) (1:1)	[CF] (% v/v)	Tubos con dilución de AE (1000 ul c/u)	Volumen de inóculo (ul) (1:1)	[CF] (% v/v)
1	1000	10	1	1000	5
2	1000	5	2	1000	2,5
3	1000	2,5	3	1000	1,2
4	1000	1,2	4	1000	0,6
5	1000	0,6	5	1000	0,3

6	1000	0,3		6	1000	0,15
7	1000	0,15		7	1000	0,07
8	1000	0,07		8	1000	0,03
9	1000	0,03		9	1000	0,01
10	1000	0,01		10	1000	0.007

\* [CF]: Concentración final

**Fuente:** Autores

### **Determinación de la CMI y CMB**

Luego de 18 horas de incubación se estimó la CMI correspondiente al tubo con la menor concentración de AE que fue capaz de inhibir el crecimiento visible de *S. aureus*.

A partir del tubo que presentó la CMI de forma ascendente a las concentraciones se procedió a realizar subcultivos, colocando 100 ul de cada tubo en cajas de agar Mueller Hinton por la técnica de extensión en agar con asa de Drigalsky. Se incubó a 37 °C y se evaluó el crecimiento bacteriano a las 24, 48 y 72 horas, estableciendo como la CMB a la caja que no presente crecimiento alguno perteneciente al tubo de menor concentración del cual proviene el inóculo. Los resultados obtenidos en la prueba de macrodilución se presentan en el anexo 5.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del análisis fitoquímico por TLC de los aceites esenciales de *Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum* fueron comparados con datos bibliográficos existentes referente a estas especies, con el fin de asegurar que las muestras vegetales analizadas en este estudio corresponden realmente a las especies en cuestión; al igual que se asoció el rendimiento de cada AE. La determinación de la actividad antimicrobiana fue expresada en base a los resultados obtenidos en la prueba de macrodilución en caldo en donde se estableció la CMI y la CMB de cada uno de los aceites investigados.

#### 4.1. Rendimiento de los aceites esenciales de *Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum*

El rendimiento de los aceites esenciales de *Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum*, fueron expresados en porcentaje de rendimiento, así, los valores obtenidos fueron del 0.64% y 1.19% respectivamente.

**Tabla 19.** Rendimiento de los aceites esenciales de *Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum*

AE	Materia prima (kg)	% Rendimiento
<i>Citrus limonia</i>	0.9	0.64
<i>Syzygium aromaticum</i>	0.9	1.19

**Fuente:** Autores

*Syzygium aromaticum* es una de las pocas especies vegetales que pueden alcanzar un rendimiento en aceite esencial superior al 1 % como se puede evidenciar en este caso, al igual que lo reportado por Castaño Sepúlveda (2012) quien obtuvo hasta un 3.1 % de rendimiento en aceite esencial de clavo de olor, mientras que, Navarrete *et al.* (2010) reporta para el género *Citrus* una tasa de rendimiento aproximada del 0.5%. A pesar de que los rendimientos obtenidos en este estudio varían en relación a los datos reportados por Castaño Sepúlveda (2012) en el caso de *Syzygium aromaticum*, el mismo autor menciona que esta propiedad podría encontrarse relacionada directamente a los criterios de extracción como la especie, el método de extracción empleado, frescura, entre otros, los cuales pueden afectar su rendimiento así como la composición química y las propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales.

#### 4.2 Factores de retención y caracterización colorimétrica de los analitos presentes en el aceite esencial de *Citrus limonia* por TLC

La identificación de los analitos presentes en el aceite esencial de *Citrus limonia* se realizó mediante el cálculo y comparación de los factores de retención obtenidos a partir de cada mancha formada en el cromatograma con el de sus respectivos patrones. En la tabla 20 se presentan los *R<sub>f</sub>*s y características colorimétricas obtenidas en la TLC del aceite esencial de *Citrus limonia*.

**Tabla 20.** Factores de retención y caracterización colorimétrica de los analitos presentes en el aceite esencial de *Citrus limonia* y patrones empleados por TLC

Analito	R <sub>f</sub> Muestra	R <sub>f</sub> Patrón	Color Muestra	Color Patrón
Citral	0.94	0.94	Naranja	Naranja
Limoneno	0.78	0.78	Azul	Celeste
Eugenol	0.54	0.52	Verde pardo	Verde pardo
Geraniol	0.34	0.34	Azul oscuro	Púrpura
$\alpha$ -terpineno	0.23	0.23	Verde oscuro	Verde oscuro
$\alpha$ -pineno	0.47	0.47	Azul claro	Pardo
Trans-cariofileno	0.99	0.99	Púrpura	Rosa
$\beta$ -pineno	---	---	---	---

**Fuente:** Autores

Si bien los *R<sub>f</sub>*s obtenidos en la TLC del aceite esencial de *Citrus limonia* coinciden con el de los patrones, las características colorimétricas difieren en el caso del limoneno,  $\alpha$ -pineno, geraniol y trans-cariofileno, esto puede deberse a que los analitos presentes en el aceite esencial no se encuentran completamente puros por lo que pueden presentar variaciones en el color debido a una mezcla de sustancias con un mismo *R<sub>f</sub>*, como indican Ruiz et al. (2015).

Tras presentarse variaciones en la identificación colorimétrica del cromatograma del AE de *Citrus limonia* de los compuestos limoneno,  $\alpha$ -pineno, geraniol y trans-cariofileno se decidió emplear una segunda prueba confirmatoria en fase reversa con placas de TLC C18. Cuando no es posible obtener una separación satisfactoria de los analitos utilizando NPC

cuya fase estacionaria polar se constituye principalmente de sílice no modificada, es posible utilizar RPC donde la fase estacionaria se conforma de sílice funcionalizada con cadenas de organosilanos de longitudes de carbonos específicas (C2, C8 y C18), la cual aumenta su apolaridad conforme aumenta el número de carbonos, lo que permite una mayor retención de compuestos apolares como los que constituyen los AE. Así, los analitos identificados en el aceite esencial de *Citrus limonia* mediante la comparación de los valores de *R<sub>f</sub>*s calculados en el cromatograma tanto en NPC como RPC frente a los valores de *R<sub>f</sub>*s de los patrones empleados coincidieron, comprobando de esta manera la presencia de los compuestos investigados. (Esquivel & Leal, 2004)

Rojas et al. (2013) mencionan que en el aceite esencial obtenido del epicarpio de *Citrus aurantifolia* es posible encontrar grandes concentraciones de limoneno y terpineno, coincidiendo con Contreras et al. (1980), los cuales en su estudio realizado con el aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (limón de pica) y *Citrus limonium* (limón génova), indican que los cítricos en general poseen limoneno como principal componente, además de otros como trans-cariofileno, geraniol, citral, eugenol,  $\alpha$ -pineno, y  $\alpha$ -terpineno en diferentes proporciones coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Navarrete et al. (2010) Demuestran la presencia de  $\beta$ -pineno como el segundo componente más abundante en el aceite esencial de estos cítricos, sin embargo, este no se logró identificar en el aceite esencial de *Citrus limonia* lo cual podría deberse a que la caracterización química de los aceites esenciales varía en función de la especie, factores ambientales y zona de cultivo tal como indican Ruiz et al. (2015); por otra parte otras de las razones podría asociarse al método empleado ya que si bien este permite identificar cualitativamente la presencia de una gran variedad de compuestos en base a patrones establecidos, su sensibilidad es baja cuando de concentraciones mínimas se trata.

#### **4.3 Factores de retención y caracterización colorimétrica de los analitos presentes en el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* por TLC**

Para la identificación de los componentes del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* se procedió de la misma manera que con el aceite esencial de *Citrus limonia* en base a los factores de retención, sin embargo en este caso se determinó únicamente la presencia de eugenol en el cual los *R<sub>f</sub>*s tanto de la muestra como del patrón empleado coinciden y el análisis colorimétrico obtenido es idéntico en ambas manchas.

**Tabla 21.** Factores de retención y caracterización colorimétrica de los analitos presentes en el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* y patrones empleados por TLC.

Analito	Rf Muestra	Rf Patrón	Color Muestra	Color Patrón
Eugenol	0.52	0.52	Verde pardo	Verde pardo

**Fuente:** Autores

La presencia de eugenol en esta investigación es comparable a la realizada por Aguilar & López Malo (2014) con el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* en donde determinaron su composición, indicando como principal constituyente al eugenol seguido de acetato de eugenilo, aunque también presenta bajas concentraciones de cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -bergamoteno, entre otros. Srivastava et al. (2005) tras realizar un estudio en el clavo de olor de la India y Madagascar, determinó que el principal constituyente de sus aceites esenciales es el eugenol, seguido en este caso de  $\beta$ -cariofileno, confirmando de esta manera la afirmación hecha por Ruiz et al. (2015) sobre la variabilidad de la composición química de los aceites esenciales respecto a distintos factores entre los cuales menciona la zona de cultivo, sin embargo, ambos coinciden en que el eugenol es el principal constituyente del aceite esencial de *Syzygium aromaticum*.

Souza et al. (2016) y Barros et al. (2018) coinciden con los autores antes detallados, demostrando que el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* se encuentra conformado en gran porcentaje por eugenol. Basado en estos antecedentes se realizó la investigación de eugenol en la muestra de aceite esencial de clavo de olor, confirmando su presencia tras comparar los valores de *Rf* y coloración del cromatograma frente al patrón empleado, obteniendo valores idénticos que corroboran dicha afirmación.

Debido a que los aceites esenciales constituyen mezclas de una gran variedad de compuestos, pudiendo llegar a existir hasta 100 tipos diferentes, se requieren emplear métodos instrumentales complejos y costosos para poder describir todas estas sustancias; razón por la cual en este estudio se decidió profundizar únicamente en aquellos más representativos basándose en investigaciones existentes referente a estas especies (Ruiz, et al., 2015).



Debido a que los resultados obtenidos del análisis fitoquímico por TLC de los AEs analizados en este estudio confirman la presencia de los componentes más representativos mencionados en la bibliografía, se puede asegurar que las muestras estudiadas corresponden efectivamente en el caso del limón al género *Citrus* y del clavo de olor a *Syzygium aromaticum*.

#### 4.4 Determinación de la actividad antimicrobiana de los AEs de *Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por difusión en agar

Los resultados obtenidos en la prueba de difusión en agar fueron expresados en milímetros luego de medir los halos de inhibición formados a diferentes concentraciones de aceite esencial, los mismos que se presentan en la tabla 22.

**Tabla 22.** Medias de los halos de inhibición resultantes de la prueba de difusión en agar de los aceites esenciales de *Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum*.

AE	[C] (% v/v)	R1 (mm)	R2 (mm)	R3 (mm)	Media (mm)	DS	IC 95%	
<i>Citrus limonia</i>	100	15	16	15	15.3	0.6	14.7	16.0
	80	14	15	16	15.0	1.0	13.9	16.1
	60	13	13	11	12.3	1.2	11.0	13.6
	40	11	12	11	11.3	0.6	10.7	12.0
	20	9	8	8	8.3	0.6	7.7	9.0
	10	7	8	8	7.7	0.6	7.0	8.3
	5	7	6	7	6.7	0.6	6.0	7.3
	2.5	7	6	7	6.7	0.6	6.0	7.3
<i>Syzygium aromaticum</i>	100	30	28	31	29.7	1.5	27.9	31.4
	80	29	28	30	29.0	1.0	27.9	30.1
	60	22	22	24	22.7	1.2	21.4	24.0
	40	22	23	21	22.0	1.0	20.9	23.1
	20	13	15	14	14.0	1.0	12.9	15.1
	10	13	14	14	13.7	0.6	13.9	14.3
	5	8	9	10	9.0	1.0	7.9	10.1
	2.5	8	9	9	8.7	0.6	8.0	9.3

\*[C]: Concentración

\*R: Replica

\*DS: Desviación estándar

\*IC: Intervalo de confianza

**Fuente:** Autores

Se calculó la media de los halos de inhibición formados en cada concentración ensayada y se ajustó a un intervalo de confianza del 95 % para asegurar que todos los valores obtenidos se encuentran dentro del mismo sin presentar variaciones significativas.

De acuerdo con Ramírez y Marín (2009) los halos de inhibición cuyo diámetro es mayor a 6 mm (diámetro del disco de papel filtro) evidencian la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, de tal manera que mientras mayor sea el diámetro se consideraría una mayor actividad antimicrobiana. Si bien las dos especies estudiadas demostraron una marcada inhibición frente a la cepa de *Staphylococcus aureus*, fue *Syzygium aromaticum* quien exhibió una mayor actividad en comparación con *Citrus limonia* lo cual se vio reflejado por el diámetro de los halos de inhibición manifestados.

#### 4.5 Resultados obtenidos por el método de macrodilución en caldo: CMI y CMB de los aceites esenciales de *Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum*

**Tabla 23.** Control de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en la determinación de la CMI las 18 horas.

	[C]	R1	R2	R3		[C]	R1	R2	R3
<i>Citrus limonia</i>	10%	-	-	-	<i>Syzygium aromaticum</i>	5%	-	-	-
	5%	-	-	-		2,5	-	-	-
	2,5	-	-	-		1,2	-	-	-
	1,2	-	-	-		0,6	-	-	-
	0,6	-	-	-		0,3	-	-	-
	0,3	+	+	+		0,15	+	+	+
	0,15	+	+	+		0,07	+	+	+
	0,07	+	+	+		0,03	+	+	+
	0,03	+	+	+		0,01	+	+	+
	0,01	+	+	+		0,007	+	+	+

\*[C]: concentración

\*R: replicas

\*(+): crecimiento positivo

\*(-): sin presencia de crecimiento visible

**Fuente:** Autores

**Tabla 24.** Control de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en la determinación de CMB durante 72 horas.

		24 H			48 H			72 H		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>Citrus limonia</b>	<b>10%</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>5%</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>2,5</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>1,2</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>0,6</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>0,3</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>0,15</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>0,07</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>0,03</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>0,01</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Syzygium aromaticum</b>	<b>5%</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>2,5</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>1,2</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>0,6</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>0,3</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>0,15</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>0,07</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>0,03</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>0,01</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<b>0,007</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\*[C]: concentración

\*R: replicas

\*(+): crecimiento positivo

\*(-): sin presencia de crecimiento visible

**Fuente:** Autores

**Tabla 25.** CMI y CMB de los aceites esenciales de *Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum* frente a *Staphylococcus aureus*

	AE de <i>Citrus limonia</i> (% v/v)		AE de <i>Syzygium aromaticum</i> (% v/v)		Control positivo CN (ug/ml)	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<b>R1</b>	0.6	2.5	0.3	1.25	0.25	2
<b>R2</b>	0.6	2.5	0.3	1.25		
<b>R3</b>	0.6	2.5	0.3	1.25		
<b>Media</b>	0.6	2.5	0.3	1.25	0.25	2
<b>DS</b>	0	0	0	0	0	0
<b>IC 95 %</b>	0.6	2.5	0.3	1.25	0.25	2

\*CMI: concentración mínima inhibitoria

\*CMB: concentración mínima bactericida

\*CN: gentamicina

\*R: replica

\*DS: desviación estándar

\*IC: índice de confianza

**Fuente:** autores

En las tablas 23 y 24 se presentan los resultados obtenidos tras realizar la prueba de macrodilución en caldo los cuales se encuentran expresados en función del crecimiento (positivo o negativo) frente a cada concentración de aceite esencial ensayada en dicha prueba. A partir de estos resultados se establecieron la CMI y la CMB como se observa en la tabla 25, ambos aceites esenciales mostraron efecto inhibitorio frente a las cepa de *Staphylococcus aureus*, sin embargo, la actividad antimicrobiana manifestada por el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* es mayor, coincidiendo con la prueba de difusión en agar realizada previamente (tabla 22). En este caso la capacidad inhibitoria de los aceites esenciales se evidenció por la CMI y la CMB las cuales mostraron concentraciones inferiores en el aceite esencial de clavo de olor.

Los datos obtenidos fueron comparables con los presentados por Argote et al. (2017) y Fu (2007), quienes realizaron la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales del género *Citrus* y la especie *Syzygium aromaticum* respectivamente frente a *Staphylococcus aureus*, obteniendo valores de 0.6 % - 0.7 % para *Citrus* y 0.125

% (v/v) para *Syzygium aromaticum*. Se observa una ligera variación con el resultado obtenido por Fu (2007) por lo que es importante considerar ciertas variables como el método de extracción del aceite esencial y el origen de la especie vegetal; Si bien el método utilizado en la determinación de la concentración mínima inhibitoria por los autores en mención es la microdilución, se dispone de revisiones bibliográficas que aseguran que las técnicas de macrodilución y microdilución son comparables difiriendo únicamente en el volumen de materia empleada (Carmilema, et al., 2010; Hamad, et al., 2017; Ramirez & Marín, 2009).

(Hamad, et al., 2017; Mahamat, et al., 2017; Mohamed, et al., 2018 & Soares, et al., 2019) determinaron la CMI del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* frente al microorganismo en cuestión indicando los siguientes resultados: 250 ug/ml, 635 ppm, 0.01 % (v/v), 2 % (v/v); indicados por cada autor respectivamente, demostrando resultados diferentes entre sí y a los obtenidos en este proyecto, por lo que se hace gran énfasis a las variables antes mencionadas.

Millezi et al. (2014) determinaron la CMI del aceite esencial de *Citrus limonia* Frente a *S. aureus* la cual presentó un valor del 10 %; dicho resultado difiere en gran medida al obtenido en el presente estudio lo cual puede verse influenciado principalmente por el método ya que dicho autor emplea la técnica de difusión en agar.

Fu et al. (2007) y Soares et al. (2019) determinaron la CMB del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* en donde obtuvieron valores de 0.250 % y 4 % (% v/v) respectivamente; Souza et al. (2016) por otra parte también determinó la CMB del aceite esencial de clavo de olor resultando este en 0.5 %. En este estudio la CMB resultante del mismo AE fue de 1.25 % el cual resultó dos diluciones más alta en relación a la CMI. Los datos obtenidos varían entre los diferentes estudios realizados por lo que no son comparables; por otra parte no se dispone de bibliografía referente a la CMB del AE de *Citrus limonia* por lo que únicamente su valor se asocia a la capacidad bactericida presentada por dicho aceite.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales puede relacionarse directamente a su composición química, ya que como menciona Stashenko (2009), tanto los monoterpenos, sesquiterpenos y algunos derivados fenólicos constituyentes principales de la mayoría de aceites esenciales presentan actividad antimicrobiana por lo que la actividad reflejada en la prueba de difusión en agar y la macrodilución en caldo puede estar estrechamente ligada a los analitos identificados en la prueba de TLC, en donde se demostró la presencia de

limoneno en *Citrus limonia* y eugenol en *Syzygium aromaticum*, entre otros compuestos, los cuales se presentan en el apartado 4.2 y 4.3 de este estudio.

Argote et al. (2017) indican que la actividad antimicrobiana del AE de diferentes cítricos puede atribuirse principalmente al limoneno, monoterpeno que se encuentra en mayor proporción de acuerdo a estudios realizados en estas especies. Pardo et al. (2017) determinaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Citrus reticulata*, en donde mencionan que dicha actividad puede deberse a la presencia de una gran variedad de componentes, haciendo énfasis en compuestos monoterpénicos como son terpineno, limoneno y pineno.

Aguilar & López Malo (2014) tras determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* frente a diversos microorganismos indicaron que la efectividad como agente antimicrobiano de dicho aceite puede deberse a que presenta compuestos fenólicos como el eugenol y acetato de eugenilo en su composición. También menciona que estos aceites esenciales en general tienen mayor efecto antimicrobiano en bacterias Gram positivas que en Gram negativas, lo que permitiría explicar la capacidad inhibitoria que presentó el aceite esencial de *Citrus limonia* (limón mandarina) sobre *Staphylococcus aureus*, evidenciado claramente tras la elaboración del presente estudio. Pandima et al. (2010) evaluaron la actividad antimicrobiana del eugenol, demostrando que este generaba daño irreversible a nivel de la pared y membrana celular bacteriana tras la exposición directa a dicho agente provocando consecuentemente la muerte bacteriana.

Zekaria (2008) y Pastrana et al. (2017) mencionan que los mecanismos de acción de los aceites esenciales no se encuentran del todo definidos sino que se presume que existe una acción sinérgica entre los componentes de la mezcla interactuando con las diferentes estructuras de la célula bacteriana, sin embargo, se cree que estos mecanismos se relacionan en mayor medida a una acción sobre la membrana plasmática produciendo daño en cada una de las capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos provocando su permeabilización, pérdida de iones, reducción del potencial de membrana, alteración de la bomba de protones y agotamiento de las reservas de ATP; también se puede producir la coagulación del citoplasma y pérdida de macromoléculas, lo que lleva a la lisis celular.

## CONCLUSIONES

Concluido el presente proyecto se pudo llegar a las siguientes conclusiones:

Fue posible extraer el aceite esencial del epicarpio del limón mandarina (*Citrus limonia*) y de las flores desecadas de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) a través de la destilación por arrastre de vapor, obteniendo un rendimiento de 0.64% y 1.19% respectivamente.

A través de la cromatografía en capa fina (TLC) fue posible identificar colorimétricamente y según los factores de retención la presencia de los principales metabolitos secundarios de *Citrus limonia* (limoneno, citral, eugenol,  $\alpha$ -pineno, geraniol,  $\alpha$ -terpineno y trans - cariofileno) y de *Syzygium aromaticum* (eugenol), los mismos que se encuentran descritos en las referencias bibliográficas, con lo que se aseguró que las muestras estudiadas corresponden a dichas especies.

Se valoró la actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales de *Citrus limonia* y de *Syzygium aromaticum* contra la bacteria *Staphylococcus aureus subsp. aureus* cepa ATCC 25923 mediante el método estandarizado de macrodilución en caldo, obteniendo una CMI de 0.6 % para el aceite esencial de *Citrus limonia* y 0.3 % para *Syzygium aromaticum*; y una CMB de 2.5 % y 1.25 % respectivamente mediante el método estandarizado de extensión en agar.

## RECOMENDACIONES

Una vez concluido el estudio se pueden establecer las siguientes recomendaciones:

Para poder optimizar el rendimiento de los aceites esenciales, sería recomendable emplear un destilador industrial.

Si bien este estudio permitió hacer una determinación cualitativa de los metabolitos secundarios de los AEs en cuestión, sería necesario realizar un análisis mediante cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS) para tener una estimación exacta en cuanto a su composición cualitativa y cuantitativa.

Se recomienda realizar la determinación de la CMI de los aceites esenciales estudiados mediante el método de microdilución en caldo, con el fin de comparar los resultados obtenidos y establecer posibles variaciones relacionadas al método empleado.

Es recomendable realizar ensayos preliminares para la determinación de la concentración adecuada de Tween 20 que se va a emplear en la formulación de las emulsiones para la prueba de macrodilución; ya que en este proyecto se evidenció que existe variación en la estabilidad de las emulsiones a diferentes concentraciones de aceite esencial y entre los dos aceites investigados debido a sus características físico-químicas.

Basado en los resultados obtenidos en este proyecto se recomienda realizar adicionalmente estudios químicos y farmacológicos en estas especies vegetales ya que como se observó, presentan una importante actividad antimicrobiana lo que podría servir como una base para el desarrollo científico de posibles alternativas antimicrobianas en diferentes campos industriales, incluyendo el de la salud.



**BIBLIOGRAFÍA y REFERENCIAS:**

- Aguilar, E., & López Malo, A. (2014, Diciembre). *Extractos y aceite esencial del clavo de olor (Syzygium aromaticum) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos*. Retrieved from <http://web.udlap.mx/tsia/files/2014/12/TSIA-72-Aguilar-Gonzalez-et-al-2013.pdf>
- Aguillon, K., Flores, J., Leal, S., & Posada, T. (2011, Noviembre). *Prueba de Ryan Joiner*. Retrieved from <http://estadistec.blogspot.com/2011/11/equipo-8.html>
- Albarracín, G., & Gallo Palma, S. (2003, Diciembre). *Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando piper aduncum procedente de la zona cafetera*. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/989/1/gloriacristinaalbarracinmontoya.2003.pdf>
- Alvarez Manzo, R. (2016, Noviembre 24). *Cromatografía*. Retrieved from <https://www.slideshare.net/xiuhts/cromatografia-69503302>
- Argote Vega, F. E., Suarez-Montenegro, Z. J., & y otros. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2, 52-60. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v15nspe2/1692-3561-bsaa-15-spe2-00052.pdf>
- Armas Caballero, C., Márquez Villacorta, L., & Pretell Vásquez, C. (2011). Efecto del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y su combinación sobre la acción antifúngica en *Aspergillus flavus* en agar chicha de maíz (*Zea mays* L.), variedad morado. *Pueblo continente*, 22(1), 123-132. Obtenido de <http://journal.upao.edu.pe/PuebloContinente/article/view/459/424>
- ATCC. (2019). *Staphylococcus aureus subsp. aureus Rosenbach (ATCC® 25923™)*. Retrieved from <https://www.atcc.org/Products/All/25923.aspx>
- Ávalos García, A., & Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3), 119-145. Obtenido de [https://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo\\_secundario\\_de\\_plantas.pdf](https://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf)



- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2007). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 446-475. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507004541>
- Barros Gomez, P. R., Mouchrek Filho, V. E., Ferreira Rabêlo, W., Albuquerque do Nascimento, A., & Costa Louzeiro, H. (2018). Chemical characterization and cytotoxicity of clove essential oil (*Syzygium aromaticum*). *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 37-52.
- Bellosos, W. (2010). *Historia de los antibióticos*. Obtenido de [https://www.hospitalitaliano.org.ar/multimedia/archivos/noticias\\_attachs/47/documentos/7482\\_102-111-belloso.pdf](https://www.hospitalitaliano.org.ar/multimedia/archivos/noticias_attachs/47/documentos/7482_102-111-belloso.pdf)
- Bravo Velásquez, E. (2014). *La Biodiversidad en el Ecuador*. Quito: Universitaria Abya-Yala. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6788/1/La%20Biodiversidad.pdf>
- Britania. (Noviembre de 2015). *Britania*. Obtenido de Britania: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5b6b262facd0e.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5b6b262facd0e.pdf)
- Bustos Martínez, J. A., Hamdan Partida, A., & Gutiérrez Cárdenas, M. (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev. Biomed*, 17, 287 - 305.
- Cabrera, Y., Fadrugas, A., & Guerrero, L. (Junio de 2005). *Antibióticos naturales. Mito o realidad*. Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21252005000300025](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252005000300025)
- Carmilema Sánchez, C. S., & Delgado Delgado, R. A. (2010). “Validación del método de microdilución para la actividad antimicrobiana de extractos de plantas (ortiga, ajeno, malva olorosa)”. Cuenca-Ecuador: Universidad de Cuenca.
- Castaño Sepulveda, M. V. (2012). *Evaluación de la capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo (Syzygium aromaticum) y canela (Cinnamomum verum), sobre la levadura (Rhodotorula mucilaginosa) en leche chocolatada* Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/9149/1/43013611.2012.pdf>



- Cavalieri, S. J., & et al. (2005). *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*. American Society for Microbiology. Obtenido de <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
- Celis Urquiza, L. Y. (2010, Octubre 02). *Usos medicinales del clavo de olor (Syzygium aromaticum (L.) Mer. et Perry)*. Retrieved from <http://www.tlahui.com/medic/medic31/clavo.pdf>
- Cerón Martínez, C. E. (2006). Plantas medicinales de los Andes Ecuatorianos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 285-293. Obtenido de <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2018.pdf>
- Cerutti, M., & Neumayer, F. (2004, Junio). *Introducción a la obtención de aceite esencial de limón*. Retrieved from file:///C:/Users/TOSHIBA/Downloads/Dialnet-IntroduccionALaObtencionDeAceiteEsencialDeLimon-3331453.pdf
- Cervantes García, E., García González, R., & Salazar Schettino, P. (2014). *Características generales del Staphylococcus aureus*. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
- Cervantes Sandoval, A., & Marques Dos Santos, M. J. (2015). *Diseño de experimentos. Curso Práctico*. Retrieved from [https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/biologia/ecocuan/ecocuan\\_dis\\_manual.pdf](https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/biologia/ecocuan/ecocuan_dis_manual.pdf)
- CFSPH. (2007, Agosto 28). *Enterotoxina B estafilocócica*. Retrieved from [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/entertoxina\\_B\\_estafilococica.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/entertoxina_B_estafilococica.pdf)
- Cientisol. (2014). *Miscibilidad entre disolventes*. Retrieved from <http://www.cientisol.com/images/7-datos-interes/miscibilidades-entre-disolventes.pdf>
- CLSI. (2015). methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard - tenth edition. *Clinical and laboratory standards institute*, CLSI document M07 - A10.
- CLSI. (2019). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Wayne, PA; Clinical and Laboratory Standards Institute.



- Contreras, E., Masson, L., Fuentes, R., & Abarca, M. (1980, Septiembre). *Composición del aceite esencial de limón de pica (Citrus aurantifolia) por cromatografía gas líquido*. Retrieved from [http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/121135/Composicion\\_CONTRERA\\_S\\_1980.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/121135/Composicion_CONTRERA_S_1980.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Cuesta Centella. (Julio de 2014). *LABORATORIO OPTIMUM QUALITY*. Obtenido de LABORATORIO OPTIMUM QUALITY: <http://blog.dopriegodecordoba.com/wp-content/uploads/2014/07/Gu%C3%ADa-de-muestro.pdf>
- Dehesa, M. (2002). *Control de Calidad de los Fitofármacos*. Retrieved from file:///C:/Users/TOSHIBA/Downloads/Dialnet-CONTROLDECALIDADDELOSFITOFARMACOS-5968376.pdf
- Díaz, A. (2011, Octubre 28). *Staphylococcus aureus*. Retrieved from <https://es.slideshare.net/Altajimenez/staphylococcus-9931675>
- Duke, J. A. (2002). *CRC Handbook of Medicinal Spices*. New York: CRC. Retrieved from [https://books.google.com.ec/books?id=vPTLBQAAQBAJ&pg=PA249&lpg=PA249&dq=citral+y+eugenol&source=bl&ots=3ToCA1Ddpn&sig=ACfU3U15h8uzMB492kNjFAhl\\_J-Z93Layw&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjdm8rmlp\\_jAhXSwFkKHTFuDpYQ6AEwD3oECAkQAQ#v=onepage&q=citral%20y%20eugenol&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=vPTLBQAAQBAJ&pg=PA249&lpg=PA249&dq=citral+y+eugenol&source=bl&ots=3ToCA1Ddpn&sig=ACfU3U15h8uzMB492kNjFAhl_J-Z93Layw&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjdm8rmlp_jAhXSwFkKHTFuDpYQ6AEwD3oECAkQAQ#v=onepage&q=citral%20y%20eugenol&f=false)
- Esquivel Soto, E. E., & Leal Guadarrama, L. I. (2004). *CROMATOGRFÍA DE FASE REVERSA*. Cuernavaca, Morelos: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. Obtenido de [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia\\_de\\_fase\\_reversa.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_fase_reversa.pdf)
- Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, S., Sun, S., & Efferth, T. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Wiley InterScience*, 989-994. doi:10.1002/ptr.2179
- Fuselli, S. R., García de la Rosa, S. B., Eguaras, M. J., & Fritz, R. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of Citrus essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. *World Journal*



of *Microbiology and Biotechnology*, 2067-2072. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-008-9711-9>

- Galindo, D., Devia, C., & Robles, J. (2012). *Actividad antitermítica de los aceites esenciales extraídos de las hojas de Lippia alba, Minthostachys mollis, Cymbopogon citratus Y Psidium caudatum contra Nasutitermes sp.* Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/d413/71fc2bd0d5af94b86a26d3590c3be1b3a6a3.pdf>
- Gil, M. (2000). *Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina.* Retrieved from <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v17n2/art10.pdf>
- González, A., & López, A. (2013). *Extractos y aceite esencial del clavo de olor y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos.* Retrieved from <http://web.udlap.mx/tsia/files/2014/12/TSIA-72-Aguilar-Gonzalez-et-al-2013.pdf>
- Hamad , A., Mahardika, M. G., Yuliani, I., & Hartanti, D. (2017). CHEMICAL CONSTITUENTS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ESSENTIAL OILS OF Syzygium polyanthum AND Syzygium aromaticum. *Rasayan J. Chem*, 564-569.
- Henríquez, Á. (2017). *Cromatografía de fase reversa.* Retrieved from <https://docplayer.es/23608053-Tema-iii-cromatografia-de-fase-reversa.html>
- Herrero, M. T. (2015, Mayo). *Especias, hierbas medicinales y plantas. Usos en medicina. Revisión de la bibliografía científica.* Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/276031152\\_Especias\\_hierbas\\_medicinales\\_y\\_plantas\\_Usos\\_en\\_medicina\\_Revision\\_de\\_la\\_bibliografia\\_cientifica\\_Medline](https://www.researchgate.net/publication/276031152_Especias_hierbas_medicinales_y_plantas_Usos_en_medicina_Revision_de_la_bibliografia_cientifica_Medline)
- Horna Quintana, G., Silva Días , M., Taboada, W., & Tamariz Ortiz, J. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Medica Herediana*, 16(1), 39-45. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v16n1/v16n1ao6.pdf>
- ISO. (1998, Diciembre 15). *Essential oils. Determination of relative density al 20°C. Reference method.* Retrieved from <https://www.sis.se/api/document/preview/895746/>



- López Luegon, T. (2004, Julio). *Los aceites esenciales*. Retrieved from <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-aceites-esenciales-13064296>
- López Sánchez, P. (2005). *Medicina Alternativa*. Retrieved from [http://www.facmed.unam.mx/deptos/familiar/compendio/Tercero/III\\_SM\\_337.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/familiar/compendio/Tercero/III_SM_337.pdf)
- López, M., Peredo, L., & García, P. (2009). *Aceites esenciales: métodos de extracción*. Retrieved from [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
- Maguiña Vargas, C. (2016). *Infecciones nosocomiales*. Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v33n3/a01v33n3.pdf>
- Millezi, A. F., Baptista, N. N., Caixeta, D. S., Rossoni, D. F., Cardoso, M. G., & Piccoli, R. H. (2014). Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Rev. Bras. Pl. Med., Campinas*, 18-24.
- Miranda Novales, M. G. (2011). Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* en México. *Scielo*, 68(4), 262-270. Obtenido de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-11462011000400003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462011000400003)
- MNCN. (2010). *Conceptos fundamentales de cromatografía*. Retrieved from [http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/principios\\_de\\_cromatografia.pdf](http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/principios_de_cromatografia.pdf)
- Mohamed, M. S. (2018). Potential Alternative Treatment of Ocular Bacterial Infections by Oil Derived from *Syzygium aromaticum* Flower (Clove). *Current Eye Research*, 873-871.
- Moromi, H., & Ramos, D. (2018, Diciembre). *Estudio in vitro del Efecto Antibacteriano de la Oleorresina de Copaifera reticulata y el Aceite Esencial de Origanum majoricum Frente a Streptococcus mutans y Enterococcus Faecalis Bacterias de Importancia en Patologías Orales*. Retrieved from [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-381X2018000400355](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2018000400355)



- Navarrete, C., Gil, J., & Durango, D. (2010). *Extracción y caracterización del aceite esencial de mandarina obtenido de residuos agroindustriales*. Retrieved from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/article/view/15779/20887>
- Ngome, M., Lembi, J. G., Freitas de Oliveira, A. C., Silva Machado, P., Mondragón Bernal, O., & Hilsdorf Piccoli, R. (2018, Julio 25). *Linalool, citral, eugenol y timol: control de células planctónicas y sésiles de Shigella flexneri*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6020087/>
- NTON-17002. (2002). *NORMA DE PROCEDIMIENTOS PARA MUESTREO DE PRODUCTOS VEGETALES*. Nicaragua. Obtenido de <http://www.fao.org/forestry/12947-09a8259bc751929ba7c7eb6c455126594.pdf>
- OMS. (2003). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s5527s/s5527s.pdf>
- OMS. (2013). *Medicina Tradicional: definiciones*. Retrieved from [https://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/definitions/es/](https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/)
- OMS. (27 de Febrero de 2017). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- OPS. (27 de Junio de 2013). *Organización Panamericana de Salud*. Obtenido de Organización Panamericana de Salud: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2013/27-junio-2013-staphylococcus.pdf>
- Ortega Lozano, A. B. (2018). *Determinación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo y orégano frente a la bacteria staphylococcus aureus ATCC:12600*. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16043/1/UPS-CT007779.pdf>
- Padrini, F., & Lucheroni, M. (2000). *Aceites esenciales para recuperar la vitalidad el bienestar, la belleza*. Retrieved from <http://www.inocua.org/site/Archivos/libros/aceites%20esenciales.pdf>





- Pandima Devi, K., Arif Nisha, S., Sakthivel, R., & Karutha Pandian, S. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 107-115. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874110002564>
- Pardo, C. G., Monsalve, G. S., Erira, A., Espinoza, Y., & Jaramillo, G. (2017). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Citrus reticulata* sobre *Fusobacterium nucleatum* asociada a enfermedad periodontal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2), 7-14. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.57921
- Paredes, D., & Quinatoa, F. (2010). *Desarrollo de un sistema de extracción de aceites esenciales*. Retrieved from <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/1710/1/15T00453.pdf>
- Pastrana Puche, Y. I., Durango Villadiego, A. M., & Acevedo Correa, D. (2017). ANTIMICROBIAL EFFECT OF CLOVES AND CINNAMON ON PATHOGENS. *Revista Bio Agro*, 56-65.
- Pesántez, M. P. (2012). *Confort térmico en el área social de una vivienda familiar en Cuenca Ecuador*. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/393/1/tesis.pdf>
- Picazo, J. J. (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- PlusVet. (2018, Junio 18). *Aceites esenciales: Mecanismo de acción sobre bacterias patógenas*. Retrieved from <http://plus.vet/aceites-esenciales-mecanismo-de-accion-sobre-bacterias-patogenas>
- Ramirez, L. S., & Marín, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*, 263-268.
- Ramírez, L., & Marín, D. (2012, Abril). *Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites*. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/849/84923878022.pdf>



- Restrepo, J. C. (2012). *Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización*. Retrieved from [http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca\\_211\\_Publicacion-CitricosCultivoPoscosechaeIndustrializacion.pdf](http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_211_Publicacion-CitricosCultivoPoscosechaeIndustrializacion.pdf)
- Reyes, E., Palou, E., & López, A. (2014). *Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales*. Retrieved from <http://web.udlap.mx/tsia/files/2015/05/TSIA-81-Reyes-Jurado-et-al-2014.pdf>
- Rodas Ceballos, M. A. (2012, Mayo). *Análisis de parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de un aceite esencial de romero obtenido por medio de la destilación por arrastre de vapor*. Retrieved from <http://biblio3.url.edu.gt/Tesis/2012/02/13/Rodas-Melisa.pdf>
- Rodríguez, J., Bischofberger, C., Alvarez, F., Asensio, A., Delgado, T., García, D., . . . Pujol, M. (2007, Octubre 31). *Vigilancia y el control de Staphylococcus aureus resistente a metilicina en hospitales españoles*. Retrieved from [https://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/hd\\_publicaciones/es\\_hd\\_on/adjuntos/GuiaStaphiloccocusC.pdf](https://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/hd_publicaciones/es_hd_on/adjuntos/GuiaStaphiloccocusC.pdf)
- Rojas Badía, M. (2010, Marzo 05). *Quorum sensing en la asociación beneficiosa de las bacterias con las plantas*. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v13n2/v13n2a12.pdf>
- Rojas Durán, R., Shiva Ramayoni, C., Kalinowski Echegaray, J., Villavicencio Gallarday, C., & Auguste Sauain, M. (2013). Composición de aceite esencial de limón cáscara como promotor de crecimiento en la industria avícola. *W P O I P C T*, 129-141. Obtenido de <https://patentimages.storage.googleapis.com/f4/4c/cb/b49a98d66908d6/WO2013129949A1.pdf>
- Romero García, A. (2002, Febrero). *Cromatografía*. Retrieved from <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf>
- Romero Mares, P. I. (2019). *Técnicas de Muestreo I*. México: Departamento de Probabilidad y Estadística IIMAS UNAM. Obtenido de <http://www.dpye.iimas.unam.mx/patricia/muestreo/notas/mas.pdf>



- Rueda Yáñez, X., & Cuadro Mogollón, O. F. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 52-61. Obtenido de <http://132.248.9.34/hevila/BistuaPamplona/2012/vol10/no1/5.pdf>
- Ruiz Alonzo, C. (2008). *Química Orgánica*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Obtenido de <http://organica1.org/1311/1311pdf10.pdf>
- Ruiz, C., Díaz, C., & Rojas, R. (2015). Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 81(2), 81-94. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v81n2/a02v81n2.pdf>
- Sánchez Puertas, M. G. (2010). *Comprobación de la actividad tintorera en fibras orgánicas y sintéticas de la Berberis hallii*. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/698/1/56T00228.pdf>
- SENA. (18 de Mayo de 2010). SENA. Obtenido de [http://repositorio.sena.edu.co/bitstream/11404/1144/1/ACEITES\\_ESENCIALES\\_EXTRACTADOS\\_DE\\_PLANTAS\\_MEDICINALES\\_Y\\_AROMATICAS.pdf](http://repositorio.sena.edu.co/bitstream/11404/1144/1/ACEITES_ESENCIALES_EXTRACTADOS_DE_PLANTAS_MEDICINALES_Y_AROMATICAS.pdf)
- Sierra Sarmiento, M. A., Barros Algarra, R., Gómez Paternina, D., Mejía Terán, A., & Suarez Rivero, D. (2018). *Productos Naturales: Metabólicos Secundarios y Aceites Esenciales*. Bogotá-Colombia: UNIAGRARIA (Fundación Universitaria Agraria de Colombia). Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/329197168\\_PRODUCTOS\\_NATURALES\\_METABOLITOS\\_SECUNDARIOS\\_Y\\_ACEITES\\_ESENCIALES](https://www.researchgate.net/publication/329197168_PRODUCTOS_NATURALES_METABOLITOS_SECUNDARIOS_Y_ACEITES_ESENCIALES)
- Silva, M. (2007, Noviembre 14). *Staphylococcus aureus*. Retrieved from [http://7staphylococcus-aureus.blogspot.com/2007/11/diagnostico-laboratorio\\_14.html](http://7staphylococcus-aureus.blogspot.com/2007/11/diagnostico-laboratorio_14.html)
- Skoog, D., West, D., & Holler, J. (2001). *Fundamentos de química analítica. Volumen 2*. Barcelona: Reverté. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=CU7yWvK1kGQC&pg=PA709&dq=cromatogr>



afia&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjAlPHR5NjjAhXCzVvKHfeCDIsQ6AEIQjAG#v=one  
page&q=cromatografia&f=false

Smith DL, K. E., & Laxminarayan, R. (2007). Emerging Infectious Diseases. *Centers for Disease Control and Prevention*, 13(12), 1840 - 1846. Obtenido de [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/12/07-0629\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/12/07-0629_article)

Soares Farias, P. K., Rodriguez Lopez, J. C., & Neves de Souza, C. (2019). Antioxidant activity of essential oils from condiment plants and their effect on lactic cultures and pathogenic bacteria. *Ciência Rural*. Obtenido de <http://www.scielo.br/pdf/cr/v49n2/1678-4596-cr-49-02-e20180140.pdf>

Souza, A. A., Días, N. A., Piccoli, R. H., & Bertolucci, S. K. (2016). Composição química e concentração mínima bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 105-112.

Srivastava, A. K., Srivastava, S. K., & Syamsundar, K. V. (2005). Bud and leaf essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from India and Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal*, 51-53. doi: <https://doi.org/10.1002/ffj.1364>

Stampella, P., Delucchi, G., & Pochettino, L. (2013). *Naturalización e identidad del "Limón mandarina", Citrus x Taitensis (Rutaceae, Aureantioideae) en la Argentina*. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/286328752\\_Naturalization\\_and\\_identity\\_of\\_limon\\_mandarina\\_Citrus\\_x\\_taitensis\\_Rutaceae\\_Aurantioideae\\_in\\_Argentina](https://www.researchgate.net/publication/286328752_Naturalization_and_identity_of_limon_mandarina_Citrus_x_taitensis_Rutaceae_Aurantioideae_in_Argentina)

Stashenko, E. (2009, Octubre). *Aceites esenciales*. Retrieved from <http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/documentos/libros/1.pdf>

Tardón, L. (22 de Abril de 2014). *El Mundo*. Obtenido de El Mundo: <https://www.elmundo.es/salud/2014/04/22/535515a3ca47413d2a8b4577.html>

UCDAVIS, U. O. (05 de Junio de 2019). *CHEMISTRY LibreTexts*. Obtenido de CHEMISTRY LibreTexts: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Ancillary\\_Materials/Demos%2C\\_Techniques%2C\\_and\\_Experiments/General\\_Lab\\_Techniques/Thin\\_Layer\\_Chromatography/Chromatography\\_I%3A\\_\\_TLC](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Ancillary_Materials/Demos%2C_Techniques%2C_and_Experiments/General_Lab_Techniques/Thin_Layer_Chromatography/Chromatography_I%3A__TLC)



- UNAM. (2007, Diciembre). *Técnicas Cromatográficas*. Retrieved from [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf)
- Usano Alemany, J., Palá-Paúl, J., & Díaz, S. (2014). Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *Reduca*, 7(2), 60-70.
- Vera Castro, J. (2018). *Evaluación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de jengibre y cúrcuma frente a la bacteria Staphylococcus aureus ATCC: 12600*. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15045/1/UPS-CT007429.pdf>
- Vida. (2013). *Aceites esenciales: precaución de uso y dosificación*. Retrieved from <https://www.vidanaturalia.com/precauciones-al-usar-aceites-esenciales/>
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. New York: Springer.
- Waksmundzka, M., Sherma, J., & Kowalska, T. (2008). *Thin layer chromatography in phytochemistry*. New York: Taylor y Francis Group.
- Yilan, F., Molina, J., Ramírez, E., Gómez, L., Quiñones, J., Ferrer, A., . . . Cuypers, A. (2016). *EVALUACIÓN CUALITATIVA DE MONOTERPENOS EN Rosmarinus officinalis CULTIVADOS CON AGUA TRATADA MAGNÉTICAMENTE*". Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v37s1/ctr18s116.pdf>
- Zekaria, D. (2008). *Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos*. Retrieved from [https://www.wpsa-aeca.es/aeca\\_imgs\\_docs/wpsa1182855355a.pdf](https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1182855355a.pdf)
- Zendejas, G., Ávalos, H., & Soto, M. (2014). *Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación*. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>
- Zubcoff, J. J. (2011, Abril 08). *Análisis de varianza de un factor (ANOVA) Test a posteriori*. Retrieved from <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/17008/1/ANOVA.PDF>

**ANEXOS****ANEXO 1**

Parámetros fisicoquímicos de solventes más empleados en TLC

Solvente	Número de miscibilidad (M)	Índice de polaridad (P')	Viscosidad cP 20°C	Punto de Ebullición °C (1atm)
N-decano	29	-0.3	0.92	174.1
Iso-octano	29	-0.4	0.50	99.2
N- Hexano	29	0.0	0.313	68.7
Ciclohexano	28	0.0	0.98	80.7
Éter butílico	26	1.7	0.70	142.2
Xileno	24	2.4	0.70	138.9
Tolueno	23	2.4	0.59	100.6
Benceno	21	3.0	0.65	80.1
Acetato de etilo	19	4.3	0.47	77.1
1-propanol	15	4.3	2.30	97.2
2-propanol	15	4.3	2.35	117.7
Acetato de metilo	15.17	4.4	0.45	56.3
Ciclohexanona	28	4.5	2.24	155.7
Dioxano	17	4.8	1.54	101.3
Etanol	15	5.2	1.20	78.3
Piridina	16	5.3	0.94	115.3
Acetona	15.17	5.4	0.32	56.3
Metoxietanol	13	5.7	1.72	124.6
Acetonitrilo	11.17	6.2	0.37	81.6
Ácido acético	14	6.2	1.26	117.9
Dimetilsulfoxida	9	6.5	2.24	189.0
Metanol	12	6.6	0.60	64.7
Formamida	3	7.3	3.76	210.5

**Fuente:**(Cientisol, 2014)

**ANEXO 2**

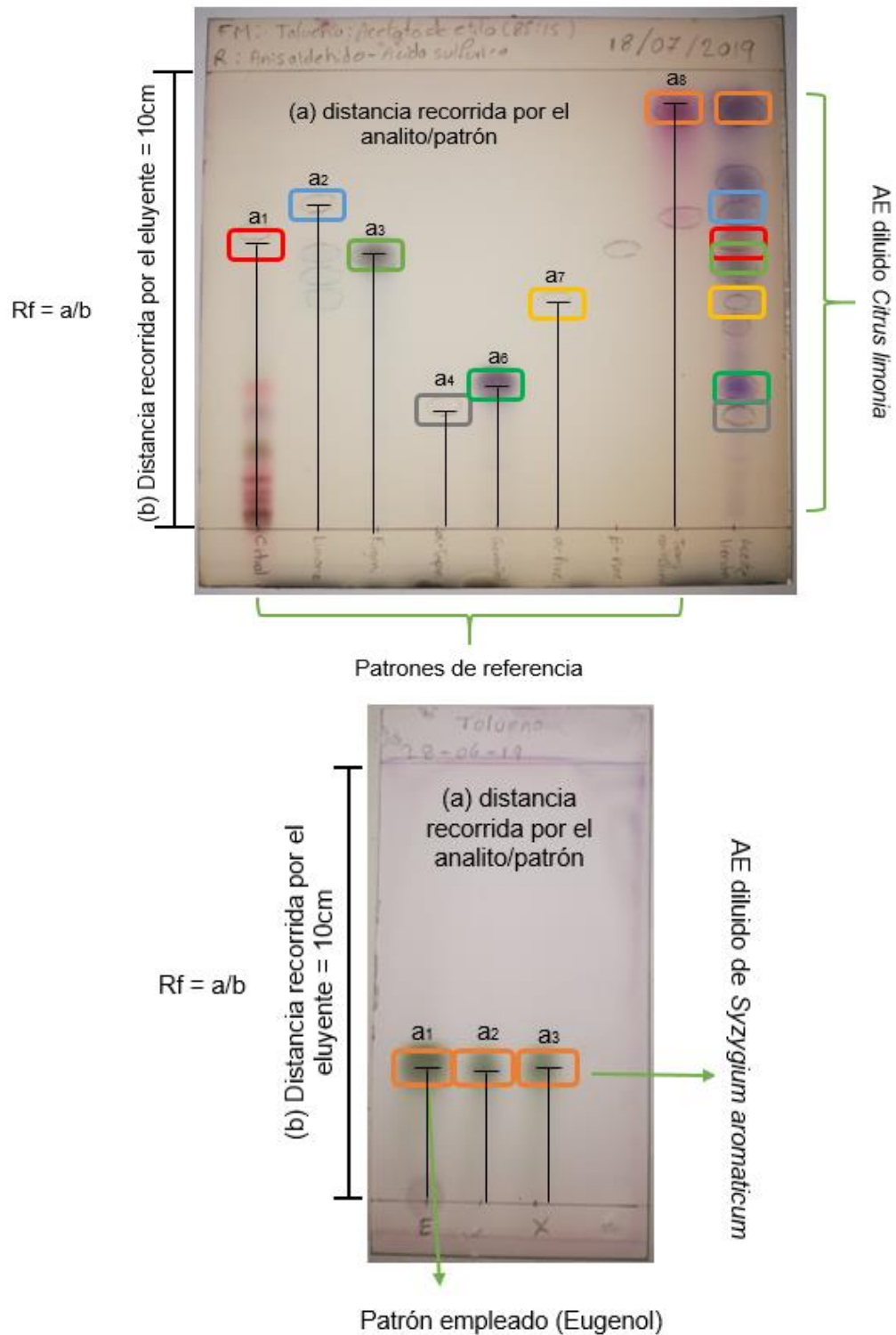
Productos de origen vegetal, descripción y tamaño mínimo de las muestras.  
NTON-17002-02, NORMA DE PROCEDIMIENTOS PARA MUESTREO DE  
PRODUCTOS VEGETALES

CLASIFICACION DE LOS PRODUCTOS	EJEMPLOS	TAMAÑO MINIMO DE LA MUESTRA
1. Productos frescos de tamaño pequeño unidades < de 25 gr.	Apio, lechuga, espinacas, guisantes y aceitunas.	1 Kg.
2. Productos frescos de tamaño medio, unidades de 25 a 250 gr.	Tomate, manzanas, naranjas, peras, melocotones, otras.	1 Kg. (10 unidades, al menos).
3. Productos frescos de tamaño grande, unidades > 250 gr.	Coles, pepinos, racimos de uvas, melones, piña, papaya y remolacha.	2 Kg. (5 unid. al menos)
4. Legumbres.	Soya, vainitas. Okra	1 Kg.
5. Hierbas aromáticas frescas.	Perejil, albahaca, otras.	0,5 Kg.
6. Especias.	Secas.	0,1 Kg.
7. Leguminosas forrajeras y otros forrajes y piensos.	-	1 Kg.

**Fuente:** (NTON-17002, 2002)

### ANEXO 3

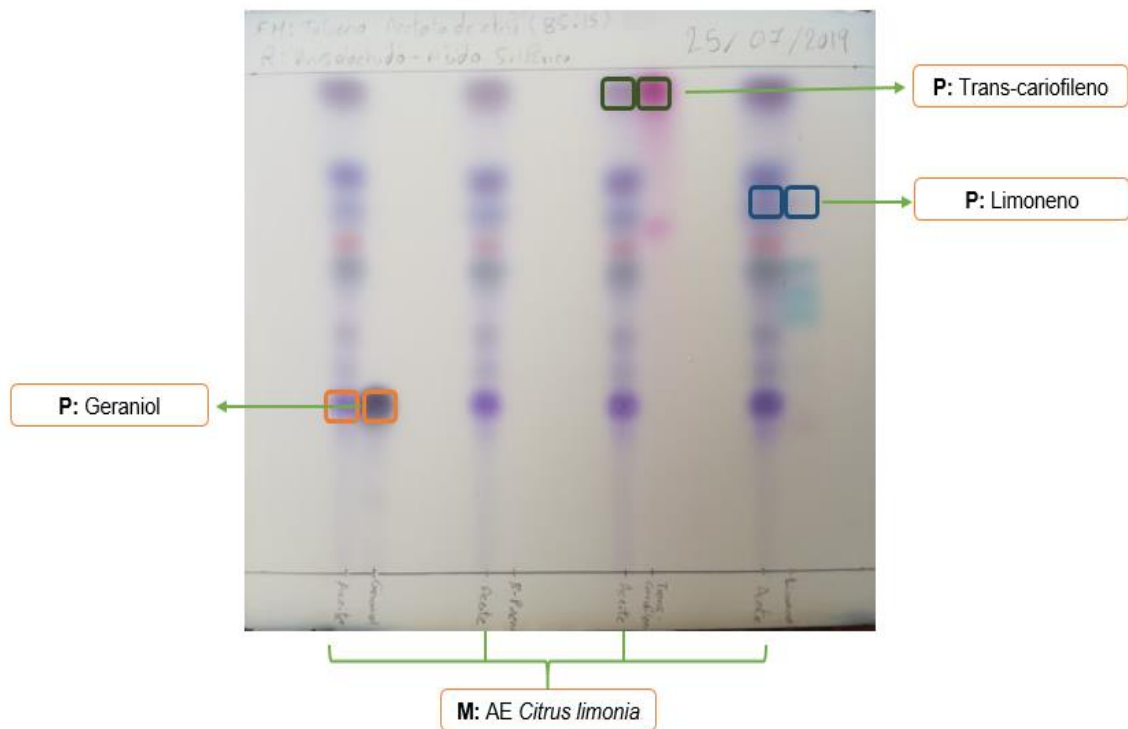
Determinación colorimétrica y cálculo de factores de retención del cromatograma obtenido a partir del aceite esencial de *Citrus limonia* y *Syzygium aromaticum*



Fuente: Autores



Cromatograma obtenido a partir del aceite esencial de *Citrus limonia* utilizando cromatografía en fase normal



\*P: patrón

**Fuente:** Autores



Cromatograma obtenido a partir del aceite esencial de *Citrus limonia* utilizando cromatografía en fase reversa.

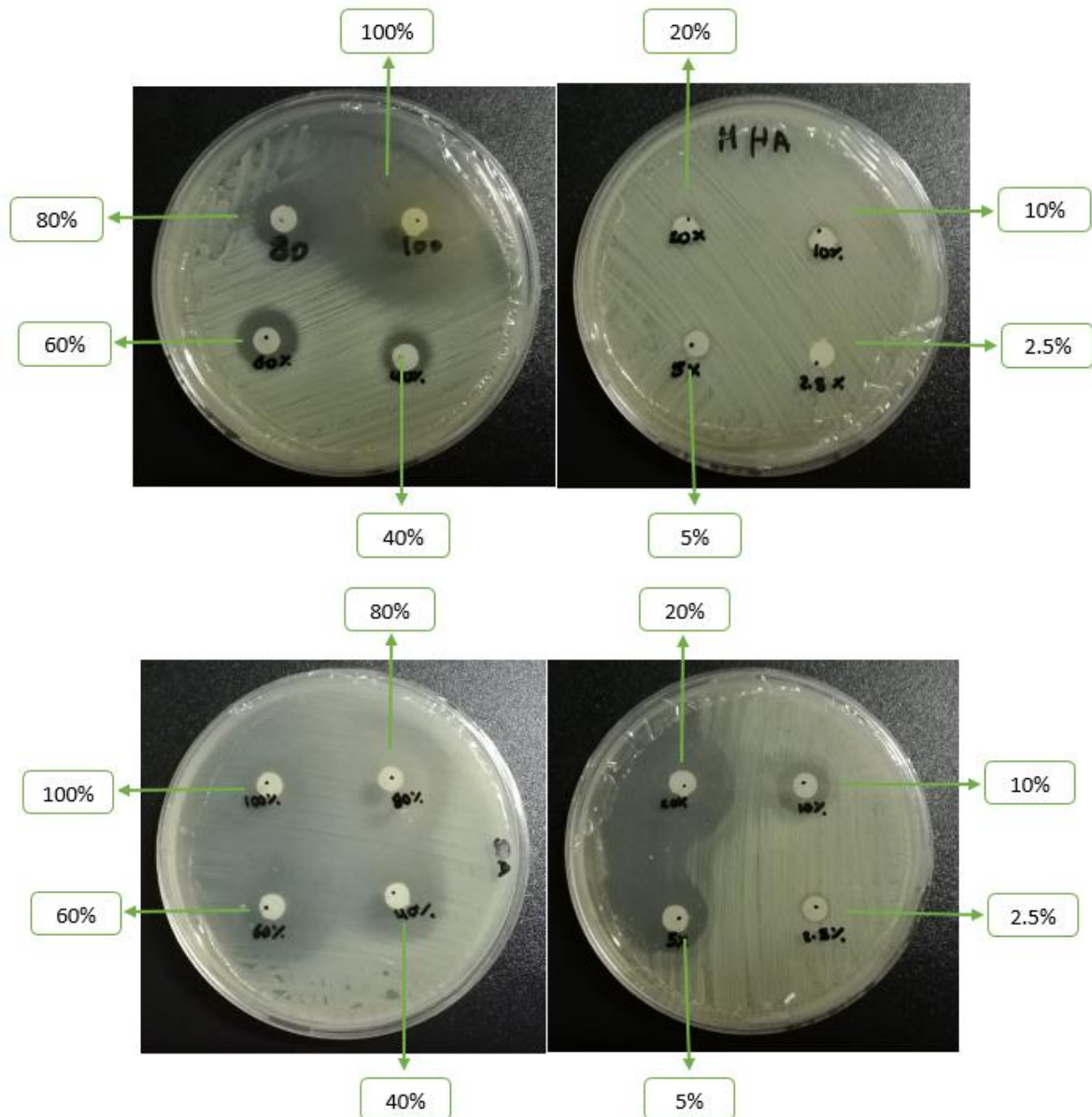


\*P: patrón  
\*GF: grupo funcional

**Fuente:** Autores

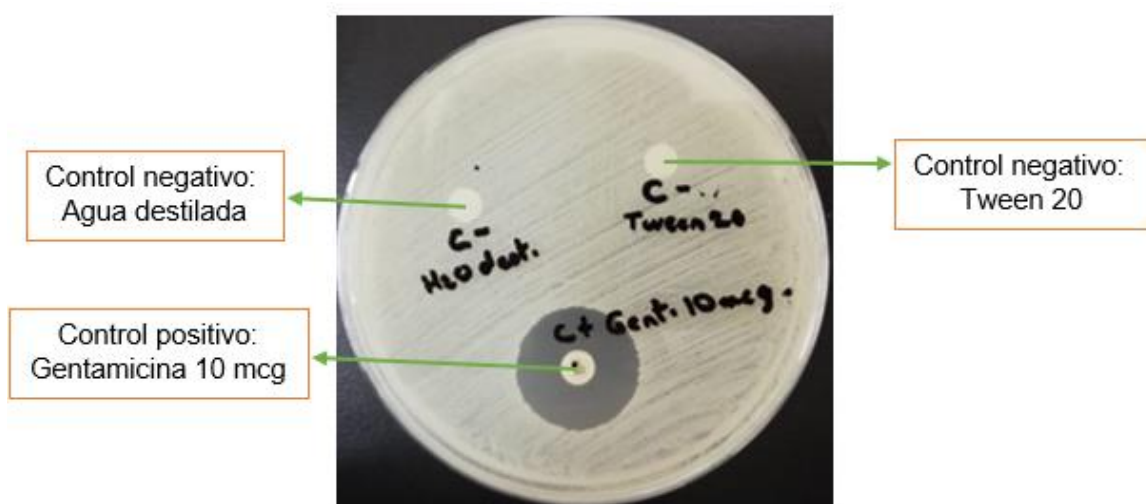
#### ANEXO 4

Método de difusión en agar por discos. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Citrus limonia* (arriba) y *Syzygium aroamticum* (abajo)



Fuente: Autores

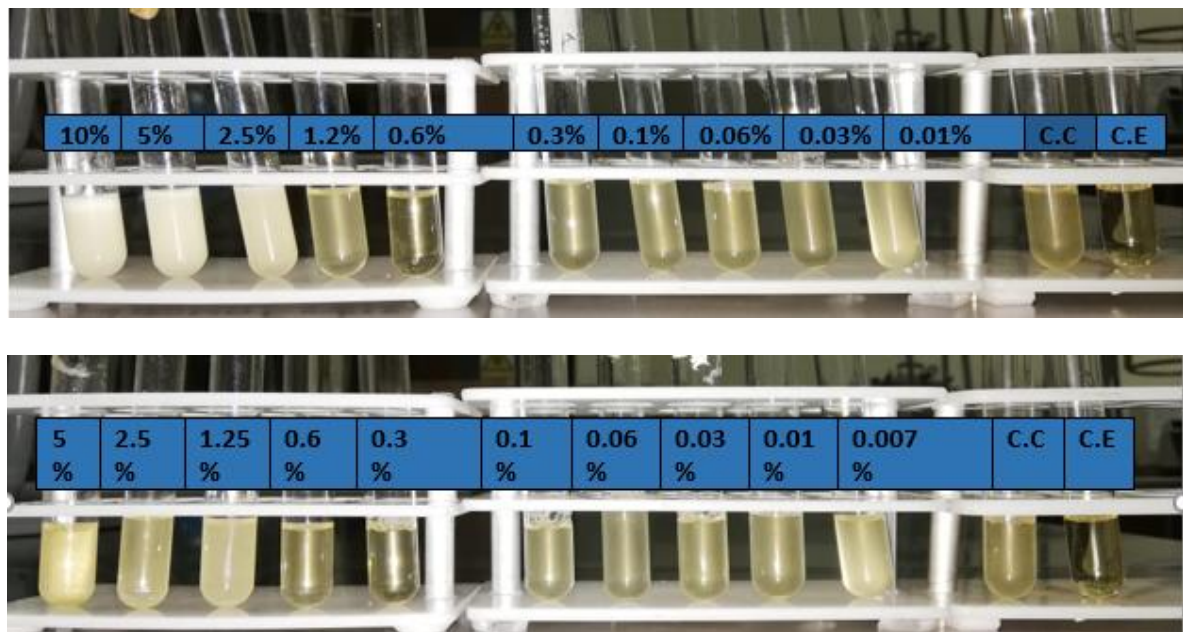
Método de difusión en agar por discos. Control negativo (Agua destilada), Tween 20 y control positivo Gentamicina (CN). Resultados a las 24h a 37°C



Fuente: Autores

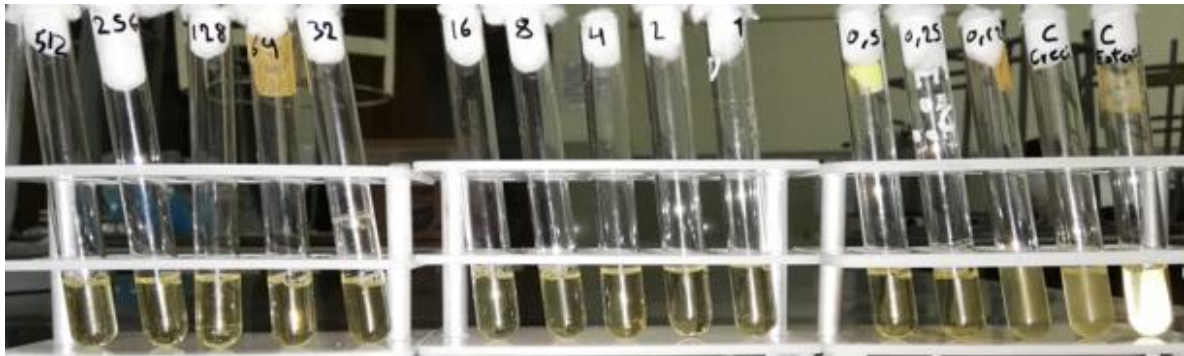
## ANEXO 5

Determinación de la CMI del aceite esencial de *Citrus limonia* (arriba) y *Syzygium aromaticum* (abajo) mediante la técnica de macrodilución en caldo.



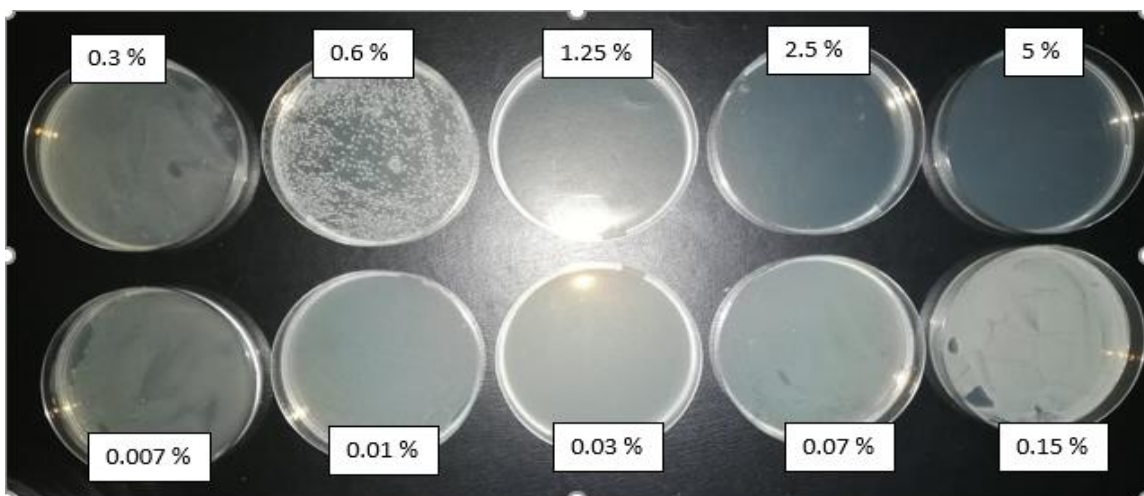
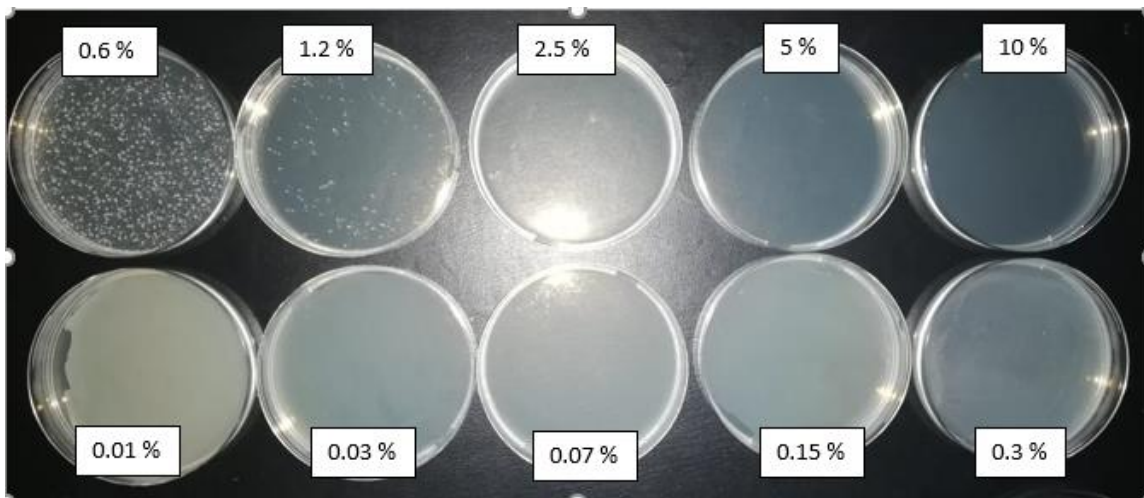
Fuente: Autores

CMI control positivo de gentamicina empleado en el método de macrodilución en caldo



**Fuente:** Autores

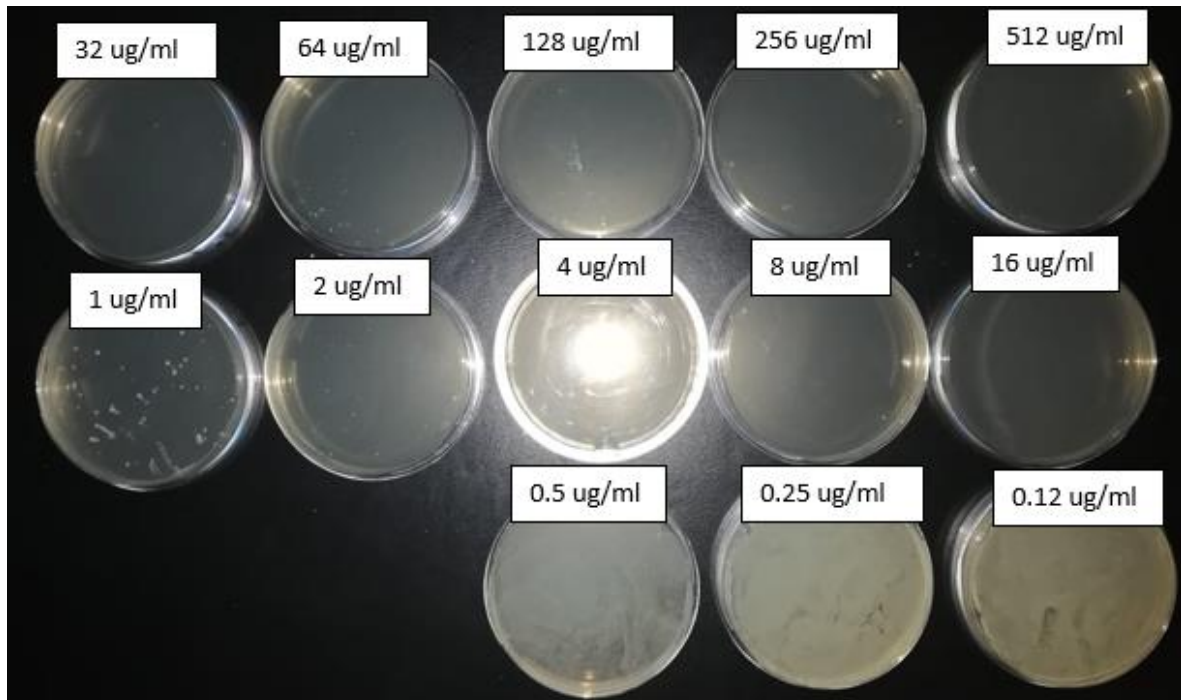
Determinación de la CMB del aceite esencial de *Citrus limonia* (arriba) y *Syzygium aromaticum* (abajo) mediante la técnica de macrodilución en caldo.





Fuente: Autores

CMB control positivo de gentamicina empleado en el método de macrodilución en caldo



Fuente: Autores

## Glosario

- **Agar:** es una sustancia derivada de algunas algas la cual se encuentra compuesta de polisacáridos lo que le da una característica gelatinosa.
- **Antiespasmódico:** son sustancias que ayudan a controlar las contracciones involuntarias y dolorosas del músculo liso del intestino conocidas como espasmos.
- **Antihelmíntico:** son sustancias o medicamentos empleados en el control de infecciones generadas por helmintos, vermes o lombrices.
- **Aldehídos:** son compuestos orgánicos caracterizados por contener en su estructura el grupo funcional - CHO.
- **Alcoholes:** son compuestos orgánicos que contienen dentro de su estructura uno o más grupos Hidroxilo (-OH).
- **Antiséptico:** son sustancias antimicrobianas destinadas a ser colocadas sobre los tejidos vivos para evitar una posible infección.

- **Antioxidante:** son moléculas o sustancias que tienen la propiedad de evitar o retardar la oxidación de ciertas moléculas constituyentes de las células o de su entorno.
- **Ácido teicoico:** son polímeros que constituyen la pared celular de la bacterias gram positivas.
- **Bactericida:** son sustancias que presentan la capacidad de matar microorganismos unicelulares principalmente bacterias.
- **Biofilms:** es un ecosistema conformado por una o varias especies de microorganismos los cuales forman una película sobre una superficie viva o inerte.
- **Cetonas:** son compuestos orgánicos caracterizados por presentar en su estructura el grupo carbonilo unido a dos radicales ( $R_1-CO-R_2$ ).
- **Células oleíferas:** son células especializadas constituyentes de la estructura de varias familias de plantas, las cuales se caracterizan por presentar un contenido oleoso en su interior.
- **Destilación:** es un método físico de separación de sustancias la cual se basa en la evaporación de una mezcla de líquidos con puntos de ebullición diferentes para luego ser condensado.
- **Enterotoxina:** son sustancias resultantes del metabolismo de ciertos microorganismos, las cuales son tóxicas para el ser humano generando principalmente enfermedades de tipo intestinal.
- **Fitoquímica:** es una ciencia que se encarga del estudio de la composición de las distintas especies vegetales.
- **Fungicida:** son sustancias empleadas para eliminar mohos y hongos que parasitan ya sea plantas, animales o el ser humano.
- **Hemolisinas:** son sustancias de carácter líidico o proteínico que produce lisis en los glóbulos rojos.
- **Peristaltismo:** es un mecanismo de contracción y relajación producidos en el tubo digestivo el cual tiene como finalidad facilitar el avance del contenido alimentario.
- **Prevalencia:** es la proporción de una población que presentan un evento o característica en un momento o tiempo determinados.
- **Peptidoglicanos:** es un polímero constituido por unidades de N-acetilglucosamina y ácido N- acetilmurámico, es el principal constituyente de la envoltura celular de las bacterias.



- **Quimiotaxis:** es una reacción de orientación que presentan las células ante diversos estímulos químicos.
- **Trazas:** cantidades imperceptibles de una sustancia.

## GALERÍA DE FOTOS

Recolección manual de los frutos del árbol de *Citrus Limonia*



Flores secas de *Syzygium aromaticum* expandidas en centros de abasto cercanos al mercado “10 de Agosto”





Proceso de selección de materia prima. Frutos de *Citrus limonia* (izquierda) Flores desecadas de *Syzygium aromaticum* (derecha)



Proceso de reducción de tamaño del epicarpio de *Citrus limonia* (izquierda) y flores desecadas de *Syzygium aromaticum* (derecha)

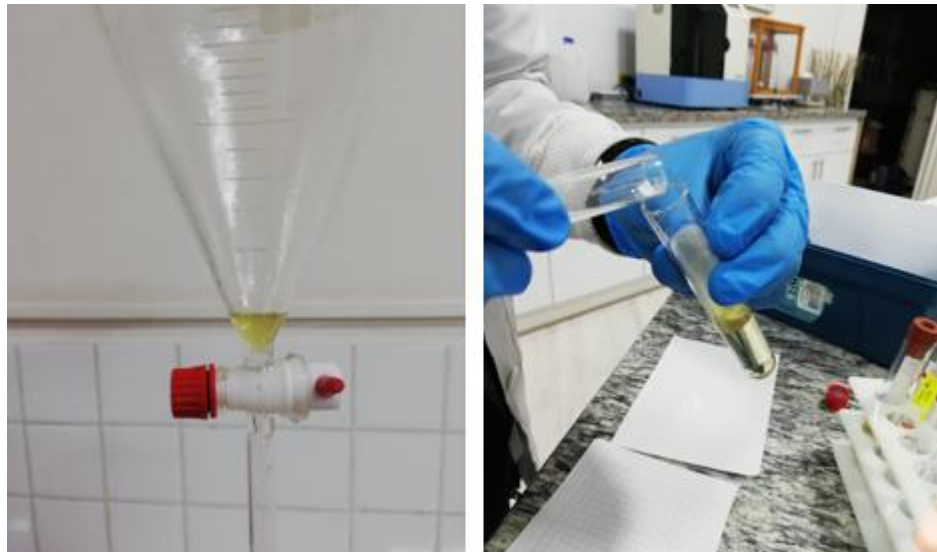


Pesaje de epicarpio troceado de *Citrus limonia* (izquierda) y flores secas trituradas de *Syzygium aormaticum* (derecha), ajustando los 0.3 Kg para cada réplica de destilado



Separación del AE de la fase acuosa en un embudo de decantación (izquierda).

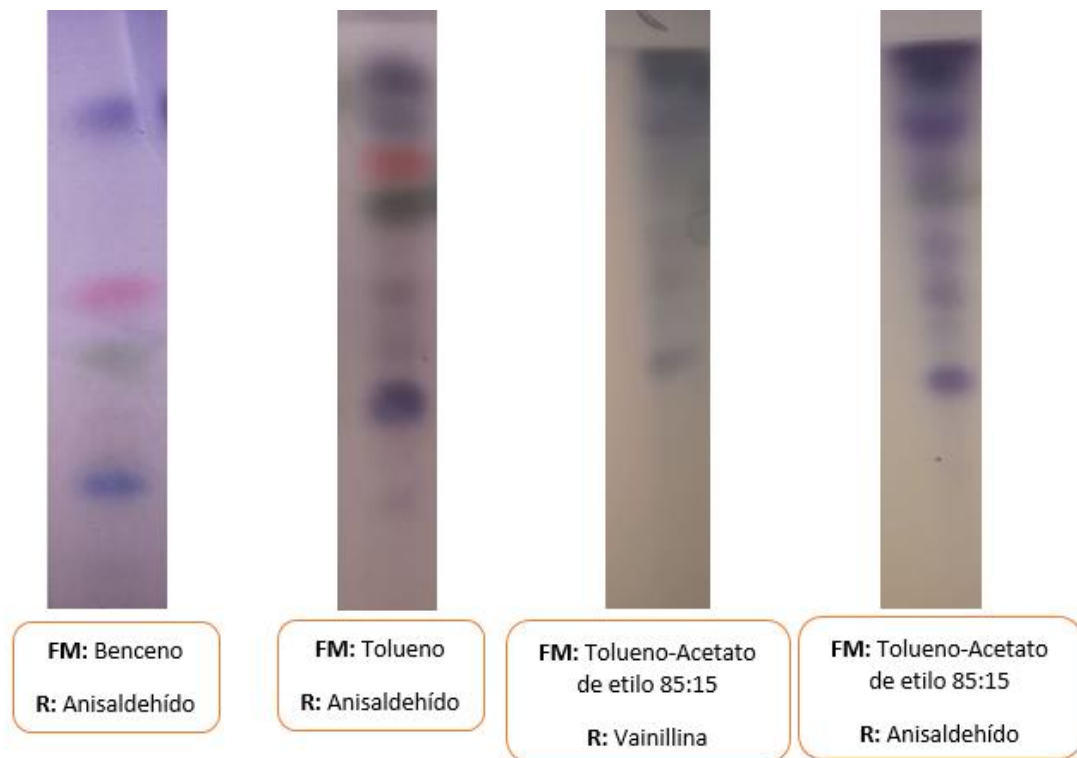
Deshidratación del AE con sulfato de sodio anhidro (derecha)



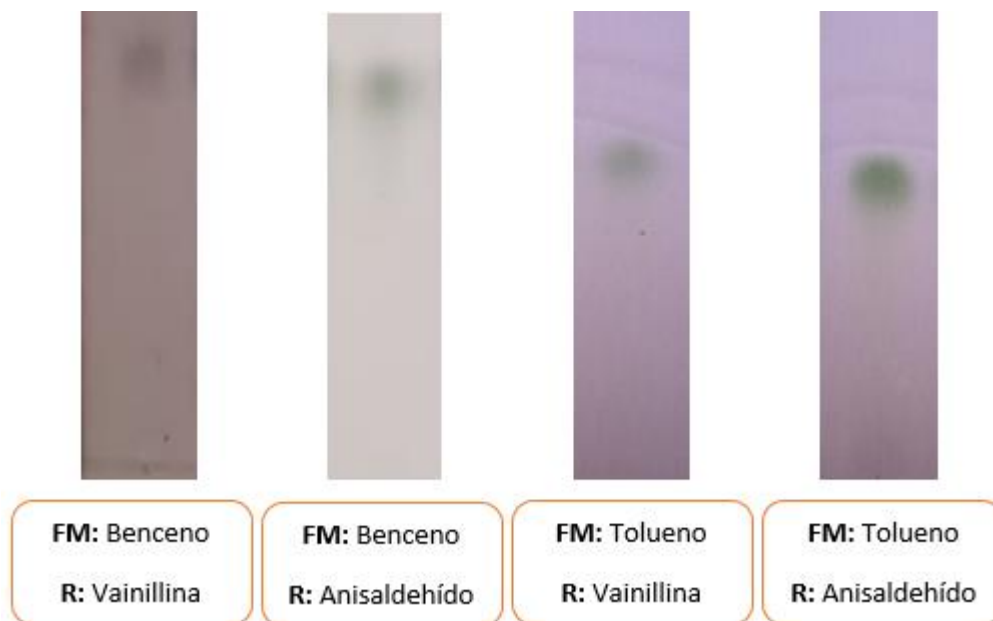
Método del picnómetro realizado a 20°C según especificaciones de la norma ISO 279:1998

<p><b>Peso del picnómetro vacío (M)</b></p>	<p><b>Peso del picnómetro + AE de <i>Citrus limonia</i> (M1)</b></p>
	
<p><b>Peso del picnómetro + AE de <i>Syzygium aromaticum</i> (M1)</b></p>	<p><b>Peso del picnómetro + agua (M2)</b></p>
	

Cromatogramas obtenidos en pruebas para determinar el mejor eluyente y revelador a partir del aceite esencial de *Citrus limonia*



Cromatogramas obtenidos en pruebas para determinar el mejor eluyente y revelador a partir del aceite esencial de *Syzygium aromaticum*


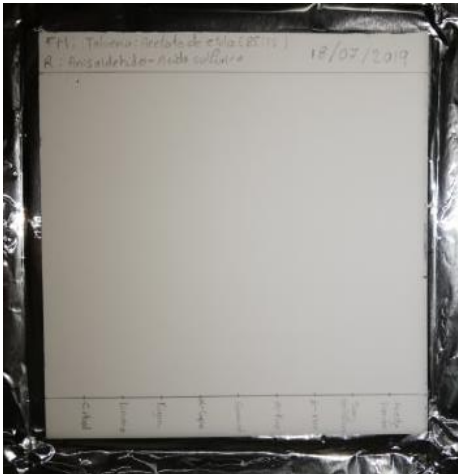


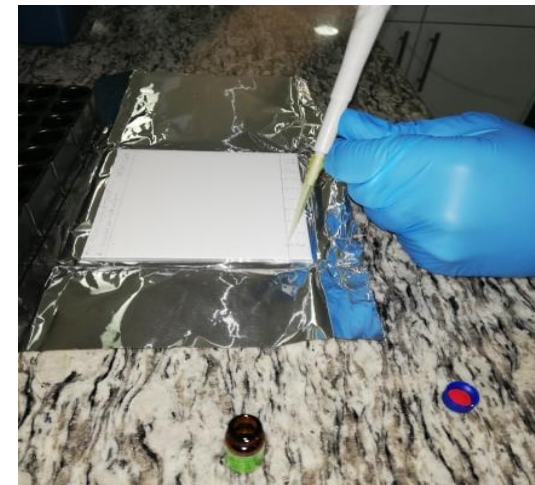


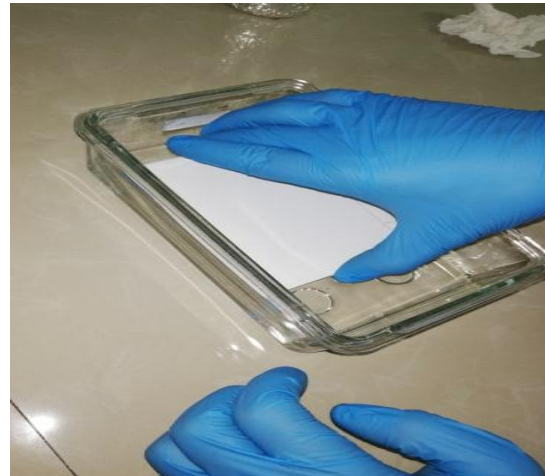
Patrones empleados en el análisis fitoquímico por cromatografía en capa fina (TLC)



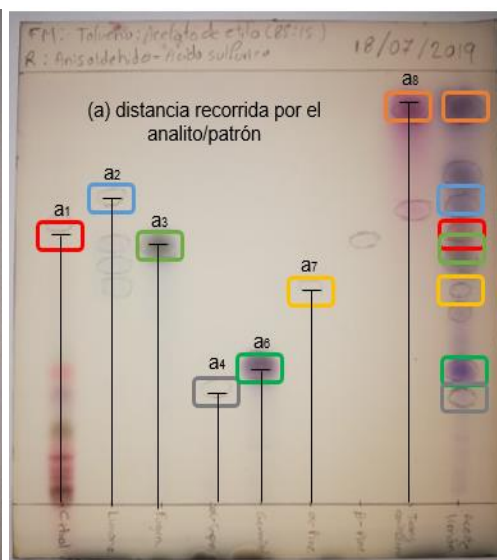
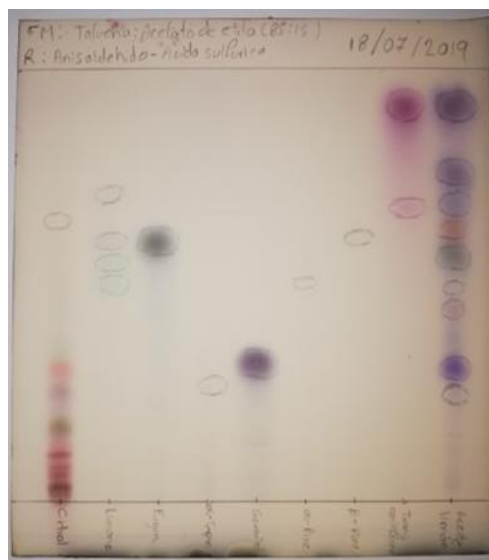
Procedimiento de corrida cromatográfica por TLC realizada durante la fase experimental de la presente tesis

<p><b>Activación de las placas cromatográficas 101°C por 1 hora</b></p>	<p><b>Delimitación de la siembra (0.7 mm a cada lado), intervalos (0.5 mm), frente del eluyente (10 cm)</b></p>
	
<p><b>Dilución del aceite esencial con tolueno 1:9</b></p>	<p><b>Preparación de la fase móvil tolueno-acetato de etilo 85:15</b></p>

**Siembra de 5  $\mu$ l de AE (muestra)****Siembra de 5  $\mu$ l de c/u patrón****Corrida cromatográfica  
(aproximadamente 30 minutos)****Revelado con anisaldehído/ácido  
sulfúrico**



**Carbonización en estufa de secado 100°C (izquierda) para lectura de cromatograma y cálculo de  $R_f$ s (derecha)**

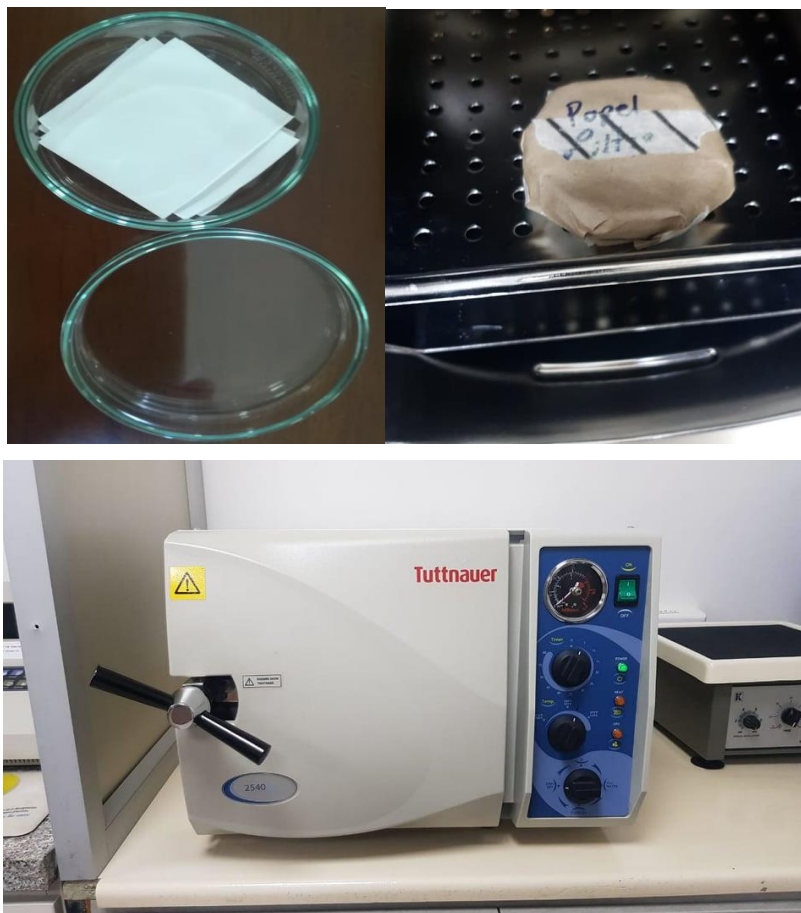




Esterilización de la perforadora por calor seco (160°C por 2 horas)

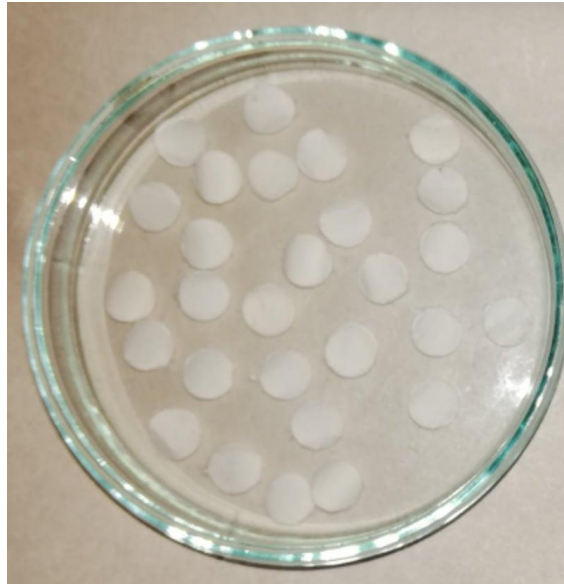


Esterilización del papel filtro por calor húmedo (121 °C por 15 minutos a 1 atm de presión)





Discos de papel filtro de 6 mm de diámetro



Liofilizado de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* cepa ATCC 25923 suspendido en  
leche descremada



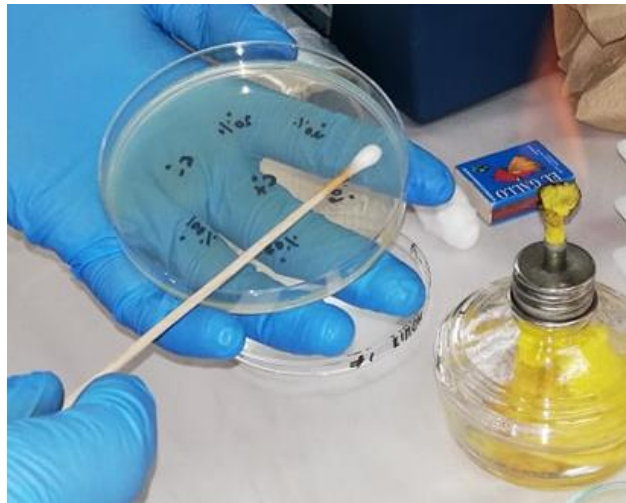
Crecimiento de *Staphylococcus aureus subsp. aureus* cepa ATCC 25923 en agar nutritivo enriquecido con sangre al 5% después de 24h a 37°C



Factor de Mc Farland 0.5 (Suspensión de colonias de *Staphylococcus aureus subsp. aureus* cepa ATCC 25923 en suero fisiológico)



Inoculación de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* cepa ATCC 25923 en agar Mueller Hinton



Diluciones seriadas (%) del Aceite Esencial de *Citrus limonia* (arriba) y *Syzygium aromaticum* (abajo) con Tween 20 al 2%



Inoculación de las respectivas diluciones de AE en cada disco



Determinación de la CMI de los AEs por el método de macrodilución

